

Funktionelle und immunologische Charakterisierung der unique region im Strukturprotein VP1 des Parvovirus B19



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER
NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III - BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vorgelegt von
Simone Dorsch aus Hof an der Saale
Juli 2001

Promotionsgesuch eingereicht am: 25. Juli 2001

Die Arbeit wurde von Prof. Dr. S. Modrow angeleitet.

Prüfungsausschuß:	Prof. Dr. A. Kurtz	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. S. Modrow	(1. Gutachterin)
	Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer	(2. Gutachter)
	Prof. Dr. R. Baumann	

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat oder Antiphospholipid Syndrom, je nach Zusammenhang
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BPB	4-Bromphenacylbromid
BSA	<i>bovine serum albumin</i> - Rinderserumalbumin
ca.	circa
CBD	Chitin-Binde-Domäne
CD	Circular Dichroismus
D	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GdmCl	Guanidinium Hydrochlorid
hMAb	<i>human monoclonal antibody</i> – humaner, monoklonaler Antikörper
IgG, IgM, IgA	Immunglobulin G, M, A
IPTG	Isopropyl-D-thiogalaktopyranosid
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
k_{on} und k_{off}	Geschwindigkeitskonstanten
K_D	Dissoziationskonstante
M	molar (mol/l)
m	<i>meter</i> - Meter

Min	Minute
MLD	Manoalid
MRW	<i>molecular residue weight</i> – Molekulargewicht einer Aminosäure
NBT	Nitroblautetrazolim
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> – kernmagnetische Resonanz
NS1	Nichtstrukturprotein des humanen Parvovirus B19
OD _{xxx}	optische Dichte bei xxx nm
ORF	<i>open reading frame</i> - offener Leserahmen
ori	<i>origin of replication</i> - Replikationsursprung
Page	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - Polymerasekettenreaktion
PLA2	Phospholipase A2
RA	rheumatoide Arthritis
RNS	Ribonukleinsäure
RPM	<i>rounds per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> - Natriumdodecylsulfat
SLE	systemischer Lupus erythematoses
T _m	Schmelztemperatur
TEMED	N,N,N', N'- Tetramethylethylethylendiamin
UV	<i>ultraviolet</i> – ultraviolettes Licht
VIS	<i>visible</i> - sichtbares Licht
VMA-I	Vakuolare Membran-ATPase I
VP1, VP2	Virales Protein 1 und 2, Strukturproteine des humanen Parvovirus B19
VP1N	VP1-unique region des VP1-Proteins des humanen Parvovirus B19
VP1N-A und VP1N-B	Verkürzte Fragmente der VP1-unique region

Zusammenfassung

Das Parvovirus B19 ist aus zwei Strukturproteinen aufgebaut, VP1 (83 kD) und VP2 (58 kD). Beide Proteine lagern sich zu einem ikosaedrischen Kapsid zusammen und umschließen die einzelsträngige DNS von 5600 Basen. Die Proteine VP1 und VP2 sind bis auf 227 Aminosäuren am aminoterminalen Ende von VP1, auch als VP1-unique region bezeichnet, identisch. Dieser Bereich ist stark immunogen und auf dem Kapsid nach außen exponiert. Eine B19-Infektion kann neben der Kinderkrankheit Ringelröteln zu verschiedenen B19-assoziierten Krankheitsbildern führen. Um einen eventuellen Zusammenhang der VP1-unique region mit verschiedenen Krankheitssymptomen bei einer B19-Infektion herzustellen, wurden B19-Virusisolate aus Patienten sequenziert und diese in ihre Aminosäuresequenz überschrieben. Die Proben stammten von Patienten mit akuten und chronischen B19-Infektionen. Die VP1-unique region ist schon aus früheren Ergebnissen als variabel bekannt. Die Variabilität zeigt sich dabei vorwiegend im aminoterminalen Bereich, wohingegen der carboxyterminale Bereich weitgehend konserviert ist. Es konnte kein Zusammenhang zwischen bestimmten Aminosäurevariationen innerhalb der VP1-unique region mit B19-korrelierten Krankheitsmanifestationen hergestellt werden.

Um den Einfluß einzelner veränderter Aminosäuren auf die Stabilität des Proteins und die Konformation der VP1-unique region zu untersuchen, wurde ein Reinigungssystem über Chitin-Affinitätschromatographie etabliert. Ein modifiziertes Intein aus *Saccharomyces cerevisiae*, an dem sich carboxyterminal eine Chitin-Binde-Domäne aus *Bacillus Circulans* befindet und aminoterminal das klonierte Proteinfsegment, wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt und das saubere, native Protein nach Zugabe eines Sulfhydrylreagens von der Säule eluiert. Neben der VP1-unique region aus dem Vektor pJB als Standardisolat wurden unterschiedliche Virusvarianten exprimiert, gereinigt und für weitere Untersuchungen eingesetzt. Über Schwingquartz-Affinitätsmessungen mit humanen, monoklonalen Antikörpern, die gegen die VP1-unique region gerichtet sind, und deren Epitop auf den Bereich der Aminosäuren 30-42 eingeeignet werden konnte, wurde die Bindung zu den Virusvarianten im Vergleich zum Standardisolat untersucht. Folgende Mutationen lagen neben oder in der Epitopregion: 17K zu R, 18A zu D, 28E zu N, 39Q zu H, 43D zu N (Isolat 1); 28E zu D (Isolat 2). Trotzdem zeigten sich keine Unterschiede in den Dissoziationskonstanten der einzelnen Bindungen. Desweiteren wurde die Bindung zu rekombinanten virus-ähnlichen

VP1/VP2-Partikeln und nativen Viren untersucht. Die berechneten Dissoziationskonstanten lagen alle in der gleichen Größenordnung. Eine Datenbanksuche ergab, daß das Epitop stark konserviert ist.

Spektroskopische Untersuchung der VP1-unique region mittels UV/VIS-, Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie ergab, daß die VP1-unique region eine stabil gefaltete Sekundärstruktur besitzt, die Tertiärstruktur hingegen nur schwach ausgeprägt ist. Diese Sekundärstruktur zeigt sich relativ stabil gegenüber Hitze, nicht jedoch gegenüber Denaturierung in GdmCl. Ebenso wirken sich pH-Änderungen sehr stark auf die Ausprägung der Sekundärstruktur aus. Die konformationelle Faltung besitzt ein pH-Optimum zwischen 8 und 9. Amino- und carboxyterminal verkürzte Fragmente der VP1-unique region (VP1N-A und VP1N-B) bilden ebenso wie das Vollängenfragment eine ausgeprägte Sekundärstruktur aus. Im carboxyterminalen Teil befindet sich das Motiv für eine Phospholipase A2.

Zur Untersuchung dieser Enzymaktivität wurden Liposomen aus Phosphatidylcholin mit der VP1-unique region inkubiert, eine Lipidextraktion angeschlossen und die extrahierten Lipidspaltprodukte im *Electrospray Ionization* Massenspektrometer charakterisiert. Die unique region spaltet das Phospholipid spezifisch an der sn-2 Position, ebenso eine Phospholipase A2 aus Bienengift als Positivkontrolle. Im Gegensatz zu dieser mußte die unique region jedoch 20fach stärker konzentriert eingesetzt werden, um eine Spaltung in der gleichen Größenordnung zu erreichen. Die Aktivität ist Ca^{2+} -Ionen abhängig und besitzt ein pH-Optimum bei 8,5. Die Inhibitoren Manoalid und Bromphenacylbromid können die Enzymaktivität hemmen.

Eine Phospholipase A2-Aktivität wird zusammen mit dem Auftreten von Antiphospholipidantikörpern diskutiert. Diese sind mit Thrombozytopenien und Thrombosen assoziiert, die bei Spontanaborten und Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis oder systemischem Lupus erythematodes auftreten können. Unsere Ergebnisse zeigen, daß eine B19-Infektion mit dem Auftreten von Antiphospholipidantikörpern korreliert, diese können für die verschiedenen B19-assoziierten Krankheitsmanifestationen verantwortlich sein.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	5
INHALTSVERZEICHNIS	7
<u>A EINLEITUNG</u>	<u>9</u>
A1 FAMILIE UND CHARAKTERISTISCHE VERTRETER	9
A2 ALLGEMEINES ZUM VIRUS	10
A3 KRANKHEITSBILDER	14
A4 IMMUNANTWORT	17
A5 DIAGNOSE UND THERAPIE	18
A6 VP1-UNIQUE REGION ALS PHOSPHOLIPASE A2	19
A7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
<u>B MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>24</u>
B1 MATERIAL	24
B1.1 KITS UND ELISA-TESTS	24
B1.2 CHEMIKALIEN	25
B1.3 SEREN	25
B1.4 OLIGONUKLEOTIDE	25
B1.5 PLASMIDE	27
B2 METHODEN	29
B2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN	29
B2.1.1 Nested PCR	29
B2.1.2 Sequenzanalyse	30
B2.1.3 Klonierungen	30
B2.2 PROTEINCHEMISCHE TECHNIKEN	30
B2.2.1 Reinigung der VP1-unique region und verkürzter Fragmente	30
B2.2.2 Herstellung virusähnlicher B19-Partikel	31
B2.2.3 Western Blot	32
B2.2.4 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	32
B2.3 BIOSENSORMESSUNGEN	33
B2.4 SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	34

B2.4.1 UV/VIS-Spektroskopie	34
B2.4.2 Fluoreszenzspektroskopie	35
B2.4.3 Circular Dichroismus-Spektroskopie	36
B2.5.4 Phospholipase A2-Assay	37
C ERGEBNISSE UND DISKUSSION	39
C1 ALLGEMEINES	39
C2 PRODUKTION DER VP1-UNIQUE REGION IN <i>E. COLI</i> UND REINIGUNG	41
C3 UNTERSUCHUNGEN ZUR GENETISCHEN UND ANTIGENEN STABILITÄT DER VP1-UNIQUE REGION	44
C3.1 VARIABILITÄT - AMINOSÄURESEQUENZ	44
C3.2 ANTIKÖRPER – AFFINITÄT ÜBER BIOSENSOREN	48
C4 KONFORMATION UND FALTUNG DER VP1-UNIQUE REGION	56
C5 FUNKTION DER VP1-UNIQUE REGION ALS PHOSPHOLIPASE A2	63
C5.1 UNTERSUCHUNGEN ZUR ENZYMAKTIVITÄT IN VITRO	64
C5.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR ENZYMAKTIVITÄT IN VIVO	72
C.6 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	76
C.7 AUSBLICK	78
D LITERATURVERZEICHNIS	79
E ANHANG	92
E1 AUFLISTUNG DER VERÖFFENTLICHUNGEN	92
E1.1 ORIGINALARBEITEN	92
E1.2 BUCHBEITRÄGE	93
E1.3 KONGRESSBEITRÄGE	93
DANKSAGUNG	96

A Einleitung

A1 Familie und charakteristische Vertreter

Das Parvovirus B19 (*parvus* = klein) gehört zu der Familie der *Parvoviridae*, welche die kleinsten, unumhüllten Viren umfaßt. Bei der letzten Überarbeitung 1995 wurde sie in zwei Unterfamilien gegliedert, den *Parvovirinae* und den *Densovirinae* (siehe Tabelle A.1). Die eher wenig erforschten Densoviren infizieren ausschließlich Insekten. Die *Parvovirinae* lassen sich aufgrund genetischer Homologien in drei Genera (Gattungen) einteilen, die Parvoviren, die Erythroviren und die Dependoviren. Zu den Parvoviren gehören Erreger wie das feline Panleukopenievirus, das verantwortlich für die Auslösung der Katzenseuche ist, oder *das minute virus of mice*. Zu den Erythroviren, zu denen auch das schon erwähnte Parvovirus B19 gehört, wurde in den letzten Jahren neben dem *simian parvovirus* ein weiterer Vertreter aufgrund seiner Sequenzhomologie hinzugefügt, das *manchurian chipmunk parvovirus*. Im Gegensatz zu diesen autonomen Parvoviren gibt es Vertreter der Dependoviren, die für die Replikation ein Helfervirus benötigen. AAV-Viren (adenoassoziierte Viren) brauchen zur Vermehrung die Ko-Infektion der Zelle mit Adeno-, Herpes- oder Vacciniaviren und integrieren spezifisch in Wirts-Zellgenom.

Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier
Parvovirinae	Parvovirus		felines Panleukopenievirus (Katzenseuche)
			<i>minute virus of mice</i>
			<i>aleutian mink disease virus</i>
			canines Parvovirus
			Schweineparvovirus
	Erythrovirus	Parvovirus B19	<i>simian parvovirus</i>
			<i>manchurian chipmunk parvovirus</i>
	Dependovirus	adenoassoziierte Viren (AAV-2, -3, -5)	bovines AAV AAV-1, AAV-4 (Affen)
Densovirinae	Densovirus		Densonucleosis-Virus
	Iteravirus		
	Contravirus		

Tabelle A.1: Charakteristische Vertreter der Parvoviren (aus Molekulare Virologie, Modrow und Falke). *Simian parvovirus* ist ein erst kürzlich charakterisiertes *Erythrovirus* (O'Sullivan *et al.*, 1994), ebenso das *manchurian chipmunk parvovirus* (Yoo *et al.*, 1999).

A2 Allgemeines zum Virus

Das Parvovirus B19 wurde 1975 zufälligerweise bei einer Hepatitis B Studie in Blutkonserven entdeckt. Sein Name stammt von der Blutkonserve 19 in Reihe B, in der es entdeckt und aufgrund seiner Morphologie als Parvovirus eingestuft wurde (Cossart *et al.*, 1975). Es ist das einzige humanpathogene Virus aus der Familie der *Parvoviridae*. Schon bald konnte es mit der Kinderkrankheit *Erythema infectiosum* (Ringelröteln) in Verbindung gebracht werden, auch als *fifth disease* oder *slapped cheek disease* bekannt. Der Ausdruck *fifth disease* stammt von den fünf Kinderkrankheiten, die mit einem Hautausschlag verbunden sind, nämlich Masern, Röteln, Windpocken, Scharlach, von denen die fünfte Ringelröteln ist. Der Name *slapped cheek disease* lässt sich durch die Bildung eines Hautausschlags erklären, der mit einer B19-Infektion verbunden ist und das Aussehen hat, als hätte man sich mit den Händen auf die Wangen geschlagen.

Der einfache Aufbau des Virus, es besteht aus zwei Strukturproteinen, VP1 (83kD) und VP2 (58kD), die sich zu einem ikosaedrischen Kapsid von 18-26nm Durchmesser zusammenlagern, steht in starkem Widerspruch zu seinem doch recht komplexen Infektionszyklus (Shade *et al.*, 1986; Ozawa und Young, 1987). Über den Respirations-trakt dringt das Virus in den Organismus ein, dabei kann man jedoch nicht wie bei

anderen Viren eine Replikation im Nasopharynxbereich feststellen (Anderson *et al.*, 1985). Wie es von dort zu seinen Zielzellen gelangt, den erythroiden Vorläuferzellen, ist unklar. Diese müssen in bestimmten Differenzierungsstadien vorliegen, BFU-E (*burst forming unit-erythroid*), CFU-E (*colony forming unit-erythroid*) und Erythroblasten, um von B19 infiziert zu werden (Ozawa *et al.*, 1986). Als Rezeptor dient das Blutgruppenantigen P, ein Glycosphingolipid, auch als Globosid bezeichnet (Brown *et al.*, 1993), welches aber nicht für den hohen Zelltropismus ausschlaggebend sein kann, da es sich auch auf reifen Erythrozyten, Megakaryozyten, fötalem Myokard, erythropoetischen Zellen der fötalen Leber, Endothelzellen, Nierenkortex und Plazenta befindet (dem Borne *et al.*, 1986; Rouger *et al.*, 1987). Eine virale Replikation konnte jedoch nur in erythroiden Vorläuferzellen, wie in humanem Knochenmark sowie in der fötalen Leber nachgewiesen werden, sodaß es vermutlich noch einen weiteren Faktor geben muß, der mit für den extremen Zelltropismus verantwortlich ist. Ein Zellkultursystem zur Vermehrung von Parvovirus B19 gibt es bisher nicht. Neben den permissiven Zellen wie z.B. Knochenmarkszellen, in denen virale Replikation stattfinden kann, existieren noch eine Reihe von semi-permissiven Zelllinien wie z.B. MB-02, JK-1, UT-7, in denen sich Parvovirus B19 in geringem Maße replizieren kann. Bei diesen Zellen handelt es sich zum größten Teil um Megakaryozytenvorläufer, bei denen nur ein Teil die erythroide Linie nach Stimulation mit den entsprechenden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren einschlägt. Die Mehrzahl aller Zelllinien, die zwar erythroide Formen enthalten, sind dennoch nicht permissiv für eine B19-Infektion, wie z.B. K562-Zellen. Anscheinend kann das Virus dabei in die Zelle eindringen, weil es in nicht-permissiven Zellen bevorzugt zu einer Expression des NS1-Gens kommt, die Strukturproteine hingegen werden trotz Vorhandenseins der entsprechenden mRNS nicht translatiert (Liu *et al.*, 1992; Morey *et al.*, 1993). Da in neuerer Zeit das Vorhandensein eines Ko-Rezeptors diskutiert wird, stellt sich die Frage, ob in nicht-permissiven Zellen ein falscher Weg beim Eindringen eingeschlagen wird, der nur zur Expression des NS1-Gens führt, oder ob vielleicht ein intrazellulärer Rezeptor, wie er auch bei Steroidhormonen vorhanden ist, die entscheidende Rolle spielt. Neben einem Ko-Rezeptor werden auch die bei Parvovirus B19 einzigartigen alternativen Spleißmechanismen bzw. die Polyadenylierungsstellen für den hohen Zelltropismus verantwortlich gemacht.

Native Viruskapside bestehen aus zwei Strukturproteinen VP1 (83kD) und VP2 (58kD). Diese Proteine sind bis auf einen aminoterminalen Abschnitt von 227 Aminosäuren

(VP1-unique region), um den das VP1-Protein länger ist, identisch. Bei einer Infektion bindet das Virus über Strukturen an seiner Dreifachsymmetrieachse der Kapside an den Rezeptor Globosid (siehe Abbildung A.1/B, Pfeil), dabei ist das VP2-Protein das hauptbeteiligte Protein (Chipman *et al.*, 1996). Der VP1-Anteil, der am Gesamtkapsid einen nur geringen Anteil von 5% beträgt, das entspricht bei 60 Kapsomeren 3 VP1-Proteinen, wird an der Fünffachsymmetrieachse auf der Kapsidoberfläche nach außen exponiert vermutet (Abbildung A.1/A, Pfeil) (Brown *et al.*, 1992; Rosenfeld *et al.*, 1992). Er wird als möglicher Kandidat für den hohen Zelltropismus bei Parvovirus B19 diskutiert. Im Gegensatz zu anderen Parvoviren bildet Parvovirus B19 keine *spike*-ähnlichen Strukturen aus (Agbandje *et al.*, 1994).

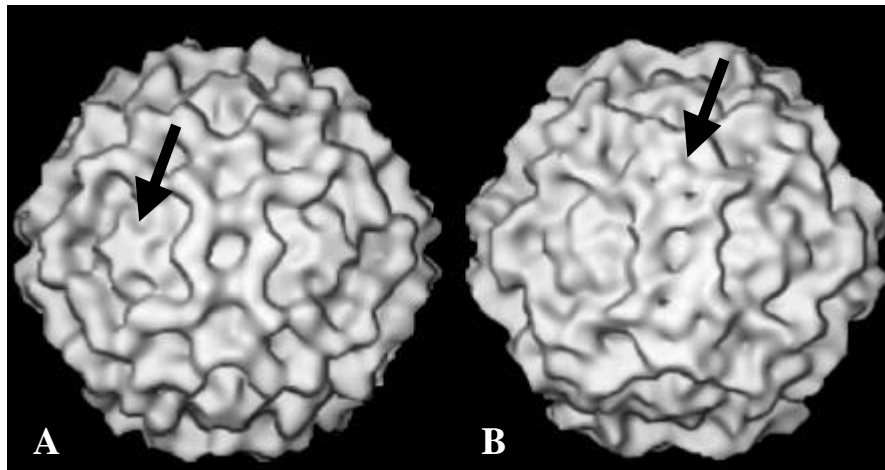


Abbildung A.1: Kryoelektronenmikroskopische Bilder von virusähnlichen VP2-Kapsiden ohne (A) und mit (B) dem potentiellen Virusrezeptor Globosid (Chipman *et al.*, 1996). Gezeigt sind rekombinant durch Baculovirus hergestellte VP2-Partikel. Der Pfeil in Abbildung (A) deutet auf die Fünffachsymmetrieachse im Kapsid, in deren Bereich die VP1-unique region vermutet wird. Der Pfeil in Abbildung (B) zeigt die Bindung von Globosid an Strukturen der Dreifachsymmetrieachse, die zu einer Konformationsänderung im Kapsid führen.

Das Genom von Parvovirus B19 (5600 Basen) besitzt an seinen beiden Enden *inverted terminal repeats* (ITRs) mit einer Länge von 383 Basen, die für die Virusreplikation wichtig sind. Diese ITRs sind zueinander komplementär und dienen als Primer für die Replikation der Virus-DNS. Der P6-Promotor am 3'-Ende an *map position* 6 bewirkt die Transkription von neun unterschiedlichen mRNS-Spezies. Deren Synthese wird über alternative Spleißmechanismen und die Verwendung unterschiedlicher Polyadenylierungsstellen in der Mitte und am 5'-Ende des Genoms reguliert (siehe Abbildung A.2). Neben den Strukturproteinen kodiert das Genom für einige

Nichtstrukturproteine. Das NS1-Protein (71kD), das im Infektionszyklus als eines der ersten Proteine exprimiert wird, spielt eine wesentliche Rolle bei der DNS-Replikation und der Transaktivierung des viralen P6-Promotors (Doerig *et al.*, 1990; (Gareus *et al.*, 1998). Eine im NS1-Protein vermutete DNS-Helikase und Endonuklease, die auch bei anderen Parvoviren zu finden sind, scheint diese Funktionen zu unterstützen. Eine nukleotidbindende Region (135 Aminosäuren in der Mitte des *open reading frame*) wird für die Toxizität des Proteins in Zellkultur verantwortlich gemacht (Momoeda *et al.*, 1994; Legendre und Rommelaere, 1992). Es ist nicht klar, ob diese Region für die apoptotische Wirkung des NS1-Proteins verantwortlich ist (Moffatt *et al.*, 1998; Sol *et al.*, 1999). Neben dem NS1-Protein gibt es noch zwei weitere kleine Nichtstrukturproteine von 11 und 7,5kD, wie in Abbildung A2 zu erkennen ist. Diese beiden kleinen Proteine konnten über Immunfluoreszenz in infizierten Zellen nachgewiesen werden, ihre Funktion ist jedoch noch völlig unbekannt (St.-Amand und Astell, 1993; Anderson und Young, 1997).

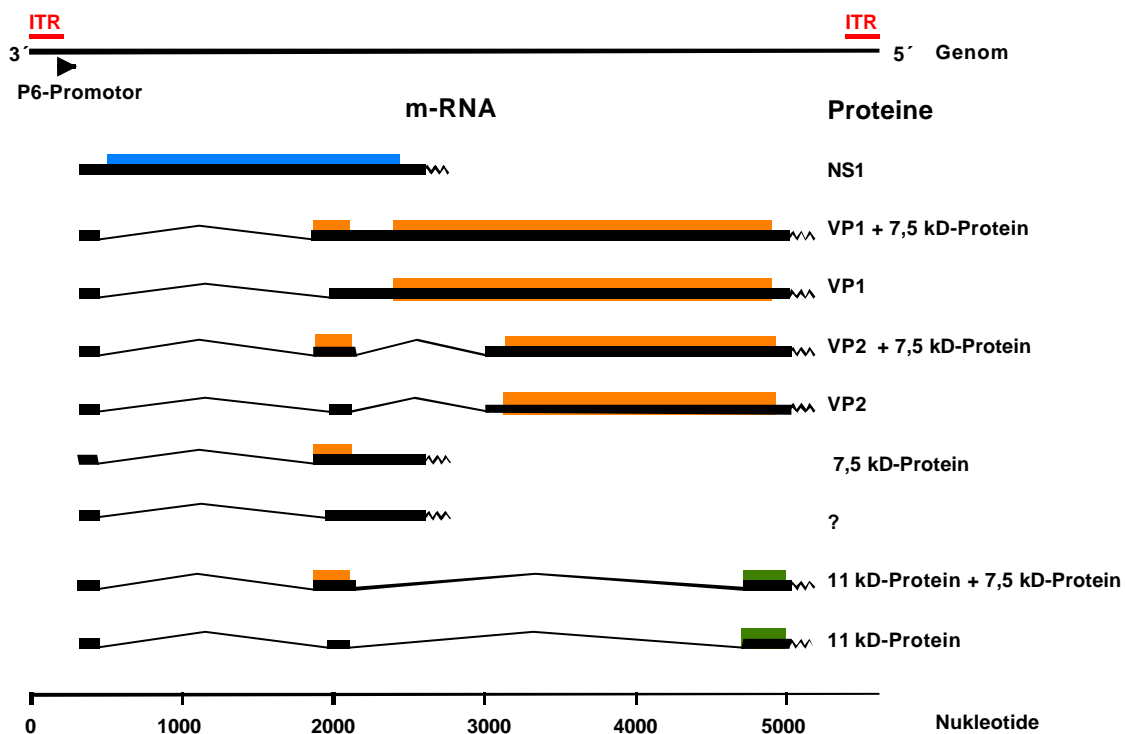


Abbildung A.2: Transkriptionskarte von Parvovirus B19 mit Angabe der offenen Leserahmen. Die Exons sind in dicken Linien, die herausgespleißten Introns in dünnen Linien, die offenen Leserahmen in grau dargestellt. Die gezackten Linien bilden die Poly A-Schwänze.

A3 Krankheitsbilder

25 bis 32% der B19-Infektionen verlaufen asymptomatisch (Chorba *et al.*, 1986; Woolf *et al.*, 1989). Neben dem schon beschriebenen *Erythema infectiosum* kann es je nach hämatologischem oder immunologischem Status der Infizierten zu einer Fülle von weiteren Krankheitssymptomen kommen.

Ein wohl sehr häufiger Nebeneffekt einer B19-Infektion ist das Auftreten von Arthritiden und Arthropathien, die sich häufig bei erwachsenen Frauen manifestieren (Reid *et al.*, 1985; Naides *et al.*, 1990). In jüngster Zeit scheint es Hinweise darauf zu geben, daß auch bei Kindern Gelenkentzündungen mit einer B19-Infektion assoziiert werden können (Moore, 2000). Die Gelenksbeschwerden dauern in der Regel ein bis zwei Wochen, können jedoch auch über Jahre bestehen bzw. wiederkehren. In einigen Fällen entsteht eine persistierende B19-Infektion, chronische B19-assoziierte Arthritis, bei der man das Virus im peripheren Blut und/ oder auch in den betroffenen Gelenken über lange Zeit nachweisen kann (Saal *et al.*, 1992; Cassinotti *et al.*, 1998; Stahl *et al.*, 2000; Lehmann, persönliche Mitteilung).

Durch seinen ausgeprägten Zelltropismus für erythroide Vorläuferzellen und deren Zerstörung können bei einer B19-Infektion Anämien auftreten. Dies wirkt sich besonders schwerwiegend bei Patienten aus, die unter chronisch hämolytischen Anämien (Sichelzellanämie, Thalassämie, Sphärocytose u.a.) oder akuter Eisenmangelanämie leiden. In Folge der Zerstörung der Erythrozytenvorläufer besteht die Gefahr von transienten aplastischen Krisen, die durch Transfusion therapiert werden müssen (Young, 1988). Daneben führt eine Reduktion von nicht-erythroiden Zellen zur Ausbildung von Thrombozytopenien und Neutropenien (Saunders *et al.*, 1986; Nagai *et al.*, 1992; Scheurlen *et al.*, 2001). Bei immunsupprimierten Patienten (angeborene Immundefizienzen, Transplantationspatienten, HIV-infizierte Personen) kann eine B19-Infektion ebenso wie bei der chronischen Arthritis einen chronisch-persistierenden Verlauf nehmen. Dies verursacht neben den schon erwähnten Thrombo- und Neutropenien eine weitere schwere chronische Anämie, die Erythroblastopenie (PRCA, *pure red cell aplasia*) (Marchand *et al.*, 1999; Pamidi *et al.*, 2000; Kariyawasam *et al.*, 2000). Die PRCA wirkt sich äußerst gefährlich bei immunsupprimierten

Transplantationspatienten aus, sodaß man eine B19-assoziierte Mortalität von etwa 7% schätzt (Schleuning *et al.*, 1999).

Bei B19-Infektionen während einer Schwangerschaft wird das Virus mit einer Wahrscheinlichkeit von 33% bzw. von 51% entsprechend neuerer Ergebnisse auf den Fötus übertragen (PHLS, 1990; Yaegashi, 2000). Der Fötus, der besonders im zweiten und dritten Trimester einer Schwangerschaft anfällig für eine Virusübertragung ist, kann durch die Zerstörung seiner erythroiden Vorläuferzellen in der Leber schwer geschädigt werden. Im schlimmsten Fall kommt es zu einem *Hydrops fetalis*, bei dem sich im Fötus durch die Infektion Ödeme und Wassereinlagerungen im Gewebe bilden (Anderson *et al.*, 1988). Dies führt unbehandelt zum Tod des ungeborenen Kindes und zum Abort. Neuere Untersuchungen in Schweden zeigen, daß neben den Fällen mit *Hydrops fetalis* 15% aller intrauterinen fötalen Todesfälle in der Spätschwangerschaft eine Assoziation mit einer B19 Infektion besitzen (Skjöldebrand-Sparre *et al.*, 2000). Keinerlei Hinweise gibt es auf Schädigungen und Mißbildungen des Embryo durch eine B19-Infektion.

B19-Infektionen werden häufig auch mit Autoimmunerkrankungen wie SLE, systemischer Lupus erythematoses, oder RA, rheumatoide Arthritis in Verbindung gebracht. Hinweise, daß das B19-Virus als ätiologisches Agens fungieren könnte, haben sich nicht bestätigt (Hemauer *et al.*, 2000; Trapani *et al.*, 1999). Jedoch kann es bei zu Grunde liegender SLE in einzelnen Fällen als Auslöser für einen neuen Schub verantwortlich sein (Hemauer *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 1999). Nach einer akuten B19-Infektion findet man im Serum sehr häufig Autoimmunantikörper wie z.B. Rheumafaktor oder antinukleäre Antikörper (ANAs) (Luzzi *et al.*, 1985; Fawaz-Estrup, 1996). In jüngster Zeit häufen sich auch die Hinweise auf Antiphospholipidantikörper (Reitblat *et al.*, 2000; Chou *et al.*, 2000; Cantalejo *et al.*, 2000; Johnston *et al.*, 2000; Loizou *et al.*, 1997; Gratacos *et al.*, 1995), die jedoch nicht mit dem Auftreten von Rheumafaktor bzw. antinukleären Antikörpern korrelieren. Antiphospholipidantikörper wurden bei Spontanaborten während der Schwangerschaft, bei rheumatoider Arthritis ebenso wie bei Granulo- und Thrombozytopenien beobachtet. Ihr Auftreten könnte durch B19-Infektionen induziert werden und so mit B19-assoziierten Krankheitsmanifestationen im Zusammenhang stehen.

Im folgenden ist eine Übersicht über die mit B19-Infektionen assoziierten Krankheitssymptome dargestellt. In einzelnen Fällen kommt es zusammen mit einer B19-Infektion zu kardiovaskulären Manifestationen wie Myocarditis oder Pericarditis (Knisley *et al.*, 1988; Orth *et al.*, 1997), Manifestationen der Haut wie *Erythema nodosum*, *Erythema multiforme* oder Hepatitiden (Langnas *et al.*, 1995; Yoto *et al.*, 1996) bzw. Enzephalopathien (Balfour *et al.*, 1970). Aufgrund ihrer geringen Häufigkeit wurden sie in der Übersicht nicht aufgeführt.

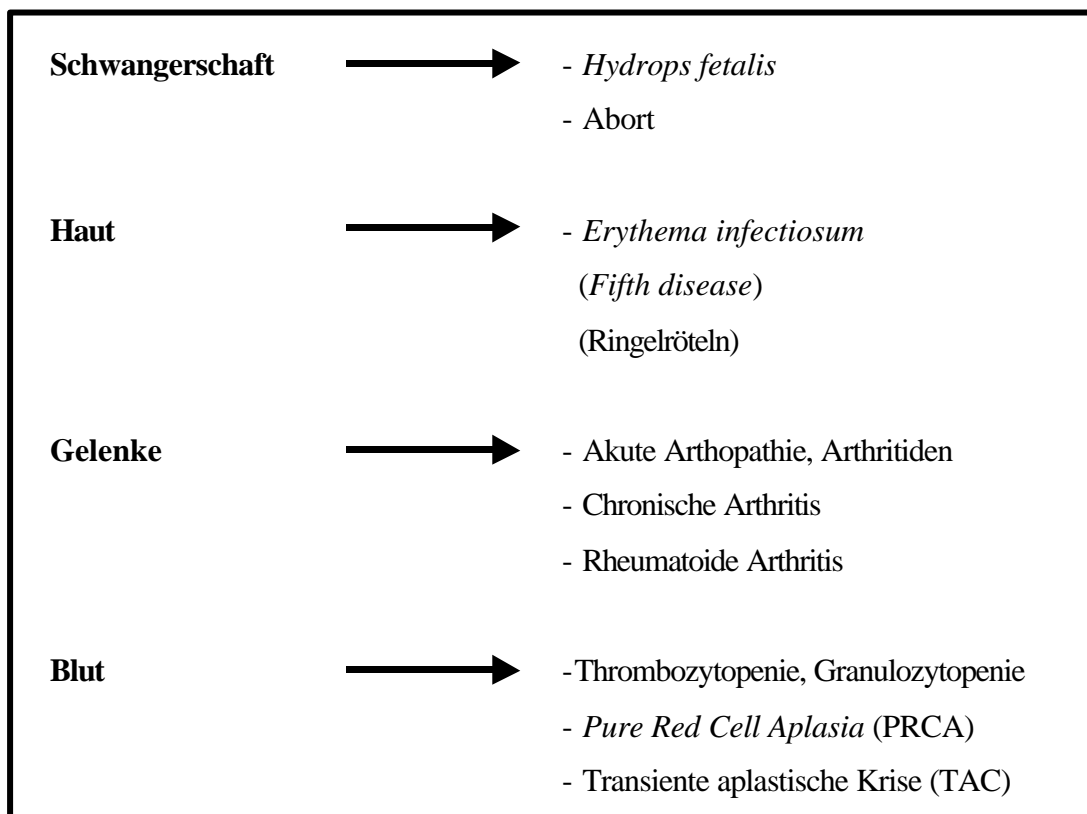


Abbildung A.3: Übersicht über die unterschiedlichen Krankheitsmanifestationen, die mit einer B19-Infektion assoziiert sind.

A4 Immunantwort

B19-Infektionen lösen in immunkompetenten Personen eine starke humorale Immunantwort aus. Bei einer Studie mit freiwilligen Probanden wurden gesunde Erwachsene beiderlei Geschlechts im Alter vom 45 bis 52 Jahren intranasal mit Virus von einem asymptomatischen Spender inokuliert. 5-6 Tage nach Inokulation werden Viruspartikel im Blut der Infizierten über PCR nachgewiesen, diese erreichen nach 8-9 Tagen eine Maximalkonzentration von etwa 10^{11} Genomkopien je ml. Erste IgM-Antikörper treten etwa 7 Tage nach Inokulation auf, dabei ist deren Konzentration nach 10-12 Tagen maximal (Anderson *et al.*, 1985; Potter *et al.*, 1987). Diese IgM-Antwort sinkt im Laufe der folgenden drei Monate ab. Verzögert findet man nach 14 bis 16 Tagen IgG-Antikörper. Sie erreichen ihre maximale Konzentration nach 3 bis 4 Wochen und sind lebenslang im Serum vorhanden. Im Normalfall können die B19-spezifischen IgGs eine Reinfektion verhindern. Bei persistierenden Virusinfektionen kann man noch Jahre nach der eigentlichen Infektion Virus-DNS im Serum nachweisen, jedoch erreicht der Virustiter hier nur etwa 10^3 bis 10^7 Genomäquivalente, deutlich weniger als bei einer akuten Infektion. Außer im Serum läßt sich bei chronischen Arthritiden Virus-DNS auch in der Synovialflüssigkeit nachweisen (Takahashi *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zur humoralen ist die zelluläre Immunantwort immer noch weitgehend ungeklärt. Bisher konnte eine lymphoproliferative Antwort gegen die VP1- und VP2-Proteine gezeigt werden. CD-4 positive T-Zellen werden dabei am häufigsten stimuliert (Poblotzki *et al.*, 1996; Franssila *et al.*, 2001).

In der Frühphase einer B19-Infektion richten sich neutralisierende Antikörper in erster Linie gegen das VP2-Protein, im weiteren Verlauf finden sich vorwiegend Antikörper gegen die VP1-unique region. Durch Experimente mit synthetischen Peptiden und rekombinanten Proteinen konnte die Lage einer ganzen Reihe immundominanter und neutralisierender Epitope in der VP1-unique region (siehe Abbildung A.4, Aminosäuren 16-99 und 142-211) charakterisiert werden (Saikawa *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1991). Diese Epitope scheinen in erster Linie (Aminosäuren 46-93 und 148-205) linear zu sein, im Gegensatz zu den Epitopen im VP2-spezifischen Bereich, die vorwiegend konformationell gefaltet sind. Später im Infektionszyklus können Antikörper gegen das Nichtstrukturprotein NS1 nachgewiesen werden, die schwach neutralisierend wirken (Gigler *et al.*, 1999). Es besteht die Hypothese, daß das NS1-

Protein Teil des Kapsids sein könnte. NS1-spezifische Antikörper wurden hauptsächlich in Studien mit B19-assoziiierter Arthritis (Poblotzki *et al.*, 1995a) und persistierenden B19-Infektionen (Poblotzki *et al.*, 1995b) gefunden, jedoch nicht bei akuten B19-Infektionen (Flunker *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse konnten von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt werden (Venturoli *et al.*, 1998; Kerr *et al.*, 1995).

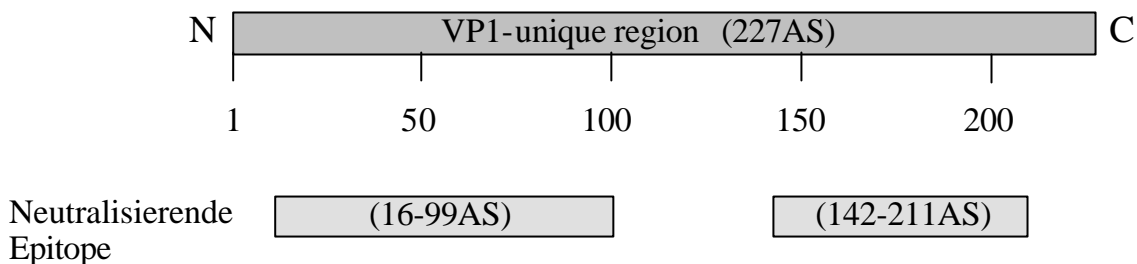


Abbildung A.4: Lage neutralisierender und immundominanter Epitope in der VP1-unique region. (Saikawa *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1993). Lineare, neutralisierende Epitope finden sich in den Bereichen von Aminosäuren 46-93 und 148-205 (Brown *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1995).

A5 Diagnose und Therapie

Die Diagnose einer B19-Infektion erfolgt durch den Nachweis von IgG bzw. IgM gegen die Strukturproteine des Kapsids. Dabei werden zwei Testsysteme zur Charakterisierung des Immunstatus eingesetzt (Söderlund *et al.*, 1995). Je nachdem, ob es sich um einen Western Blot, bei dem die Strukturproteine als Ganzes oder als Teilfragmente in denaturierter Form vorliegen, oder um einen ELISA handelt, bei dem oft rekombinant mittels Baculovirus hergestellte VP2- bzw. VP1/VP2-virus-ähnliche Partikel eingesetzt werden, kann man Antikörper detektieren, die lineare bzw. konformationelle Epitope erkennen. Zur genauen Einschätzung der Immunantwort eines Patienten sollten immer beide Tests durchgeführt werden. Eine weitere Nachweismethode, die sich zur Untersuchung einer chronischen B19-Infektion anbietet, ist die nested PCR, bei der Virus-DNS im Serum, Gewebe, Fruchtwasser oder in der Synovialflüssigkeit detektiert werden kann. Diese sehr sensitive Methode kann Genomäquivalente schon ab 100 Kopien je ml Blut quantifizieren.

Eine Therapie ist in der Regel nur bei schweren Fällen nötig, wie z.B. bei immunsupprimierten Patienten mit einer chronischen B19-Infektion. Dabei haben sich humane Immunglobulinpräparate bewährt, die ausreichende Mengen von anti-B19-IgG

enthalten. Es wird diskutiert, daß die intraperitoneale Verabreichung von Immunglobulinen bei schwangeren Frauen mit *Hydrops fetalis* den Fötus vor einem Abgang schützt. In schlimmen Fällen erfolgt eine direkte Bluttransfusion des Fötus (Susanne Modrow, persönliche Mitteilung).

Einen Impfstoff gegen Parvovirus B19 gibt es bisher nicht. Rekombinant hergestellte Proteinkapside aus den Strukturproteinen eignen sich dafür, da sie eine humorale Immunantwort stimulieren können. Neuere Ergebnisse zeigen, daß rekombinant exprimierte virus-ähnliche VP1/VP2-Partikel die Proliferation von CD4⁺ T-Lymphozyten stimuliert (Franssila *et al.*, 2001). Eine Stimulation der T-Zell Antwort ist bei einem zukünftigen Impfstoff notwendig, da bei chronischen B19-Infektionen zwar B19-spezifische IgGs vorliegen, diese aber nicht in der Lage sind, das Virus aus dem Patienten zu neutralisieren (Frickhofen *et al.*, 1990).

A6 VP1-unique region als Phospholipase A2

Aufgrund von Sequenzhomologien wurde in der VP1-unique region von Parvovirus B19 das Motiv für das aktive Zentrum einer sekretorischen Phospholipase A2 entdeckt (Peter Tijssen und Mitarbeiter, VIIth Parvovirus Workshop 1999 in Granada, Spanien).

Phospholipasen gehören zu den Esterasen, die stereospezifisch Esterverbindungen spalten, in diesem Fall Phosphoglyceride in Fettsäuren und Lysophospholipide. Die Phospholipasen werden je nach Lage der hydrolysierten Position in Phospholipasen A1, A2, C und D eingeteilt, von denen es jeweils verschiedene Untergruppen gibt. Die Phospholipase A2 katalysiert die Esterspaltung eines Phospholipids an der sn2-Position in ein Lysophospholipid und eine Fettsäure, sehr häufig eine Arachidonsäure. Allen bisher bekannten Phospholipasen A2 ist eine hohe Stabilität durch die große Anzahl an Disulfidbrücken gemeinsam. Dabei gibt es insgesamt vier Arten: calciumabhängige sekretorische *low molecular weight*-Enzyme (MW 14kD), calciumunabhängige cytosolische (MW 85kD), calciumregulierte cytosolische (MW 85kD) und lysosomale (saures pH-Optimum) Enzyme. Am besten untersucht sind die sekretorischen, *low molecular weight* Phospholipasen mit einem Molekulargewicht von 14kD zu denen auch die pankreatische Phospholipase A2 bzw. die Phospholipase A2 aus Bienengift gehört. An diesen beiden Enzymen wurde der katalytische Mechanismus und die Struktur weitestgehend aufgeklärt. Charakteristisch ist das aktive Zentrum, das analog zum *Proton-Relay*-System der Serinproteasen eine Triade aus einem Nukleophil, in

diesem Fall Wasser, His 48 und der Carboxylatgruppe von Asp 99 bildet. Stabilisiert wird diese durch die Aminosäuren Tyr 52 und Tyr 73. Zur weiteren Stabilisierung dient ein Ca^{2+} -Ion, welches durch die Aminosäuren Tyr 28, Gly 30 und Gly 32 komplexiert wird. Außerdem koordiniert das Ca^{2+} -Ion mit dem Phosphatoxyanion des Phospholipidsubstrats und mit dem Asp 49 Imidazolring. Nach dem Übergangszustand wandert ein Proton (ausgehend vom Wasser) über das Imidazol zum sn-2 Ester und führt zu den Produkten Lysophospholipid und Fettsäure. Als Bindestelle zur genauen Positionierung des Phospholipidsubstrates dient ein Tyr oder Lys an Position 69. Für die Phospholipase A2 gibt es neben der Substratbindungsstelle noch eine Grenzflächenerkennungsregion. An dieser Lipid/Wasser Grenzfläche findet die Reaktion statt und verläuft nach der klassischen Michaelis-Menten Kinetik (Nuhn und Koch, 1993). Dies erklärt, warum Phospholipasen A2 bevorzugt Phospholipid-Mizellen und weniger emulgierte Phospholipide erkennen.

Im Säuger läßt sich neben der schon erwähnten Pankreas-Phospholipase A2 eine weitere extrazelluläre Form mit 14kD, die der Gruppe der *low molecular weight* Phospholipasen A2 angehört, unterscheiden (Kramer *et al.*, 1991). Sie kommt hauptsächlich in Pankreas, Lunge, Serum, Milz und Synovialflüssigkeit vor. Je nach Herkunft besitzen extrazelluläre, nicht-pankreatische Phospholipasen A2 im Säuger unterschiedlichste Aufgaben. Die Phospholipase A2 spielt eine Schlüsselrolle bei der Produktion von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen (Eikosanoidhormone), die aus freier Arachidonsäure metabolisiert werden. Sie werden von aktivierten Neutrophilen und Mastzellen nach Stimulation abgegeben und binden spezifisch an die Zellmembranen von Blutplättchen, Neutrophilen, Chondrozyten und *macrophage-like cells* (Mayer und Marshall, 1993). Desweiteren ist die Phospholipase A2 ein Schlüsselenzym bei der Biosynthese des Plättchen-aktivierenden Faktors (*platelet activating factor*, PAF). Dieser spielt eine wesentliche Rolle bei der Thrombozytenaggregation, Gefäßerweiterung und ebenfalls bei Entzündungsreaktionen (Kudo *et al.*, 1989; Goppelt-Strube *et al.*, 1986). Im Gegensatz zu den oben genannten Eikosanoidhormonen handelt es sich dabei um ein Etherlipid, welches seine Funktion bereits in einer Konzentration von 10^{-11}mol/l entfalten kann.

Reguliert werden die sekretorischen Phospholipasen A2 durch Modulation ihrer Genexpression. Verschiedene Cytokine (IL-1, IL-6 und TNF) scheinen die Expression der Phospholipase A2-Gene heraufzuregeln (Crowl *et al.*, 1991; Oka und Arita, 1991),

Glucocorticoide dagegen bewirken das Gegenteil (Nakano *et al.*, 1990). Die Aktivität der Phospholipase A2 kann durch unterschiedliche Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen, G-Proteine und Phosphorylierung reguliert werden.

Erhöhte Phospholipase A2-Aktivitäten konnten mit unterschiedlichen Krankheitsmanifestationen in Zusammenhang gebracht werden. So wurde eine erhöhte Phospholipase A2-Aktivität in der Synovialflüssigkeit und im Serum von Patienten bei rheumatoider Arthritis gefunden (Murakami *et al.*, 1990; Mayer und Marshall, 1993; Pruzanski und Vadas, 1990). Diese führen zum einen direkt zu einer Stimulation von inflammatorischen Reaktionen über Eikosanoidproduktion und Freigabe, zum anderen werden Antiphospholipidantikörper induziert, die die Entzündungsreaktionen zusätzlich verstärken. Das Auftreten von Antiphospholipidantikörpern wird außerdem mit dem Auftreten von Granulo- und Thrombozytopenien bzw. Spontanaborten während der Schwangerschaft korreliert (Bick, 2000; Gromnica-Ihle und Schössler, 2000).

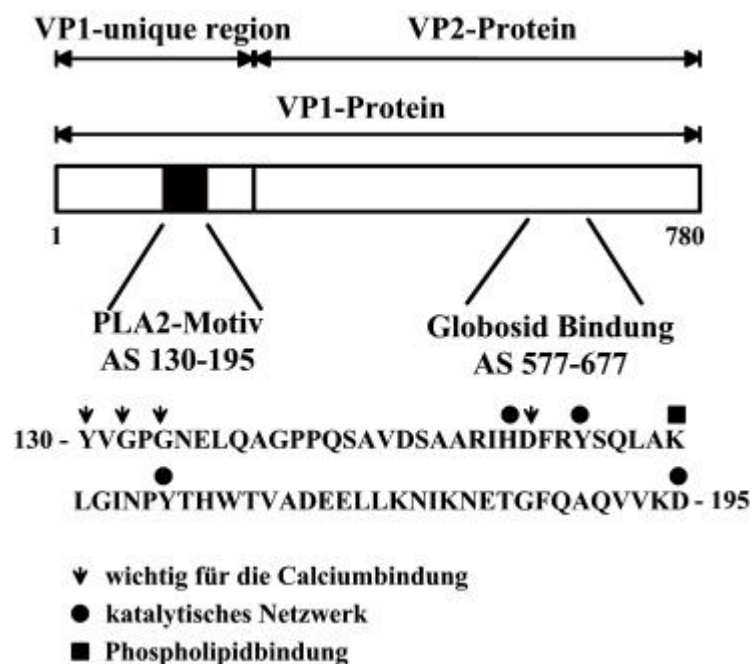


Abbildung A.5: Übersicht über die Phospholipase A2 in der VP1-unique region. Gezeigt ist das VP1-Protein mit dem Anteil VP1-unique region und VP2-Protein. Im Bereich des VP2-Proteins liegt die potentielle Bindestelle für den Rezeptor Globosid im Bereich der Aminosäuren 577-677. Die postulierte Phospholipase A2 liegt in der VP1-unique region im Bereich der Aminosäuren 130-195. Die für die Katalyse wichtigen Aminosäurereste sind hervorgehoben. Pfeile deuten auf die Reste, die wichtig für die Calciumbindung sind, Kreise zeigen die Reste, die am katalytischen Netzwerk beteiligt sind, und das Viereck deutet auf die Aminosäure, die für die hydrophobe Bindung an Lipidgrenzflächen verantwortlich ist.

Die in der VP1-unique region postulierte Phospholipase A2 besitzt bis auf wenige Unterschiede in gleichem Abstand die für die Katalyse wichtigen Aminosäurereste wie die extrazellulären, nicht-pankreatischen Phospholipasen A2 (Abbildung A.5). Die Aminosäuren 153 (His), 157 (Tyr), 168 (Tyr) und 195 (Asp) bilden das katalytische Netzwerk. Die Reste 130 (Tyr), 132 (Gly) 134 (Gly) und 154 (Asp) sind für die Ca^{2+} -Ionenbindung wichtig, und der Rest 162 (Lys) für die Bindung an Phospholipide wie z.B. zelluläre Membranen oder Kompartimente. Die unique region besitzt zwar ein Molekulargewicht von 27kD mit 227 Aminosäuren, jedoch kann man, wenn man nur den Bereich mit den für die Katalyse wichtigen Resten betrachtet, die ersten 100 Aminosäuren vernachlässigen. Die Region ab Aminosäure 100 bis 227 entspricht mit einem Molekulargewicht von ca. 14 kD der Größe der extrazellulären Phospholipasen A2. Während der Evolution könnte sich in der VP1-unique region des B19-Virus eine Phospholipase A2 aus Säuger-Phospholipasen mit einer für den Infektionszyklus wichtigen Funktion entwickelt haben. Im Unterschied zu den Phospholipasen A2, die sich durch ihre enorme Stabilität gegenüber Denaturierung und pH-Veränderung und ihren hohen Anteil an Disulfidbrücken (in der Regel sieben) auszeichnen, besitzt die VP1-unique region kein einziges Cystein.

A7 Zielsetzung der Arbeit

Die beiden Kapsidproteine VP1 und VP2 sind bis auf einen aminoterminalen Bereich im VP1-Protein von 227 Aminosäuren nahezu sequenzidentisch, dieser wird als VP1-unique region bezeichnet (Shade *et al.*, 1986; Ozawa und Young, 1987). Die VP1-unique region ist sowohl auf leeren als auch auf reifen Kapsiden nach außen exponiert (Rosenfeld *et al.*, 1992; Saikawa *et al.*, 1993; Musiani *et al.*, 2000) und spielt eine essentielle Rolle bei der Immunantwort. Innerhalb der VP1-unique region befinden sich mehrere lineare Epitope, die für die Induktion einer Vielzahl neutralisierender Antikörper verantwortlich sind. Bemerkenswert ist auch, daß diese Proteinregion im Vergleich zu anderen genomischen Sequenzen eine deutlich erhöhte Variabilität aufweist. Diese Tendenz nimmt bei chronisch infizierten Patienten weiter zu (Hemauer *et al.*, 1996). Aminosäurevariationen konnten allerdings bisher noch nie in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern gebracht werden (Hemauer *et al.*, 1996; Haseyama *et al.*, 1998). Diese Daten lassen vermuten, daß die VP1-unique region eine wichtige Rolle für das Virus spielt.

- Wie wirken sich natürlich vorkommende Aminosäurevariationen auf die VP1-unique region und das Krankheitsspektrum von B19 aus? Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde zunächst eine nested PCR für die Amplifikation dieser Region aus Virusproben etabliert. In die PCR wurden Isolate aus Patienten mit akuten und chronischen B19-Infektionen eingesetzt. Die erhaltene DNS-Sequenz wurde in die entsprechende Aminosäuresequenz translatiert und diese im Hinblick auf die Korrelation mit bestimmten Krankheitsmanifestationen bei einer B19-Infektion miteinander verglichen (Dorsch *et al.*, 2001).
- Ändert sich die immunologische Erkennung durch natürlich vorkommende Aminosäurevariationen anhand eines Antikörpers gegen die VP1-unique region, bei dem das neutralisierende Epitop auf 12 Aminosäuren eingeengt werden konnte? Zu diesem Zweck wurde ein Expressionssystem zur Klonierung und Reinigung von Varianten der VP1-unique region etabliert. Die gereinigten Proteinvarianten und ein gereinigtes Standardisolat aus dem Vektor pJB wurden über Schwingquartz-Biosensor-Messungen mit humanen, monoklonalen Antikörpern gegen die VP1-unique region auf Affinitätsunterschiede in den Antigen/Antikörper Interaktionen untersucht (Dorsch *et al.*, 2001).
- Wie wirken sich natürlich vorkommende Aminosäurevariationen auf die Struktur der VP1-unique region aus? Für diese Fragestellung wurde die VP1-unique region mittels Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie auf das Vorhandensein von Sekundär- bzw. Tertiärstrukturelementen untersucht. Neben einem Standardisolat wurde eine Variante mit der höchsten Anzahl an nicht-konservativen Aminosäurevariationen im Vergleich mit charakterisiert.
- In welchem Zusammenhang steht eine im carboxyterminalen Teil der VP1-unique region postulierte Phospholipase A2-Aktivität mit der Funktion der VP1-unique region? Zu diesem Zweck wurde eine Methode zum Nachweis der Phospholipase A2-Aktivität mittels Lipidextraktion und massenspektrometrischer Analyse der Hydrolyseprodukte etabliert. Neben dem experimentellen Nachweis der Phospholipase A2 sollte ein Zusammenhang mit B19-assoziierten Krankheitsmanifestationen untersucht werden (Dorsch *et al.*, eingereicht).

B Material und Methoden

B1 Material

B1.1 Kits und ELISA-Tests

Kits:

- | | |
|--|---|
| • Quantum Prep [®] Plasmid Miniprep Kit | Bio-Rad, München, Deutschland |
| • Protein-Assay Dye Reagent Concentrate | Bio-Rad, München, Deutschland |
| • Nuclean Gel Extraction Kit | Energene, Regensburg, Deutschland |
| • Nucleobond [®] AX für Plasmid Maxipräps | Macherey und Nagel, Düren,
Deutschland |
| • PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |

ELISA Tests:

- | | |
|--|--|
| • IgG gegen VP2-virusähnliche Partikel | Biotrin, Dublin, Irland |
| • IgG gegen Phosphatidylserin und β 2-Glycoprotein | DPC Biermann, Bad Nauheim,
Deutschland |
| • IgG gegen Cardiolipin | Pharmacia Upjohn, Freiburg,
Deutschland |
| • IgM gegen Rheumafaktor | Aeskulab Diagnostik, Wendelsheim,
Deutschland |
| • IgG gegen Rheumafaktor | Orgaentec Diagnostika, Mainz,
Deutschland |

B1.2 Chemikalien

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien waren von Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) bzw. von Merck (Darmstadt, Deutschland), die Restriktionsenzyme von New England Biolabs (Beverly, USA), die Lipide von der Firma Biotrend (Matreya, Köln, Deutschland).

B1.3 Seren

Serumproben von schwangeren Frauen mit Parvovirus B19-Infektion wurden uns freundlicherweise von Dr. Frank Louwen von der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde, überlassen. Proben von Arthritispatienten bekamen wir von Dr. Kristina Broliden, Abteilung für klinische Virologie, Huddinge University Hospital, Stockholm, Schweden. Ein Serum von einem chronisch infizierten Patienten stammte von Dr. Laurids Christiansen, Universität von Kopenhagen, Dänemark (Hasle *et al.*, 1994) und eines von Dr. Eiffert, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Göttingen, Deutschland.

Serumproben von Kindern mit Arthritiden und persistierender B19-Infektion wurden uns von Dr. Hartwig Lehmann, Pädiatrische Rheumatologie, Rheumaklinik Bad Bramstedt, Deutschland, zugesandt. Serumproben von SLE, SLE/APS und APS-Patienten wurden uns von Dr. Philip von Landenberg, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I, Universität Regensburg, Deutschland, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

B1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide stammen von der Firma Metabion, München, Deutschland.

Folgende Oligonukleotide (Tabelle B.1) dienten zur Amplifizierung der VP1-unique region Genregion aus Virusisolaten in Patientenseren und Fruchtwasserproben (B2.1.1). Die Primer der zweiten Runde wurden zur Sequenzierung der entsprechenden Genabschnitte eingesetzt (2.1.2).

PRIMERNAME	PRIMERSEQUENZ (5'-3')	SCHMELZTEMPERATUR, LAGE IM GENOM
VP1/VP2-np1-f	ATGACTTTAGGTATAGCC	T _m =50°C, 2901-2918
VP1/VP2-np1-b	AGTTTTGTCTGTAACATCC	T _m =52°C, 3511-3529
VP1/VP2-np2-f	GACTGTAGCAGATGAAG	T _m =50°C, 2956-2972
VP1/VP2-np2-b	AATTAAGTGCTGAAACTC	T _m =48°C, 3431-3448
VP1N-np1-f	GGG ACT TTG TCC CCA TTG	T _m =56°C, 2271-2288
VP1N-np1-b	CTC CTT TCC ACT GGC ATT G	T _m =58°C, 3319-3337
VP1N-np2-f	GAG AAT TTA CCC CAG ATT TGG	T _m =60°C, 2327-2347
VP1N-np2-b	GGT GCT CTG GGT CAT ATG G	T _m =60°C, 3263-3281

Tabelle B.1 Primer für die nested PCR. Lage im Genom nach pYT103 (Shade *et al.*, 1986). Folgende Abkürzungen wurden verwendet: f, forward, b, backward, np, nested PCR, T_m, Schmelztemperatur.

Folgende Primer (Tabelle B.2) wurden zur Klonierung der Plasmide VP1N-pET-int (jeweils *Standardtyp* und Virusvarianten) und der verkürzten Fragmente VP1N-A-pET-int und VP1N-B-pET-int (ebenfalls *Standardtyp* und Variante) eingesetzt. Fettgedruckt sind die jeweiligen Restriktionsenzymststellen *NdeI* (CAT ATG) und *XmaI* (CCC GGG) (B2.1.3). Die Basenfolgen GGA ATT AA bzw. TACC dienten als Linkerregion.

PRIMERNAME	PRIMERSEQUENZ (5'-3')	SCHMELZTEMPERATUR, LAGE IM GENOM
VP1N-f	GGA ATT AAC ATA TGA GTA AAA AAA GTG GCA AA	T _m =46°C, 2444-2464
VP1N-A-b	TAC CCC CGG GAG GCT TGT GTA AGT CTT CAC	T _m =58°C, 2781-2800
VP1N-B-f	GGA ATT AAC ATA TGT TAT CAT CCA GTA GCA GTC AT	T _m =58°C, 2723-2743
VP1N-b	TAC CCC CGG GCA TGC TTG GAT ATT TTT CTG	T _m =54°C, 3108-3128

Tabelle B.2 Primer zur Klonierung der Fragmente VP1N, VP1N-A und VP1N-B in den Vektor pET21a-int. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: f, forward, b, backward, T_m, Schmelztemperatur.

Zur Kontrolle der Klonierung wurde über folgende Primer (Tabelle B.3) der Einbau des Gens in den entsprechenden Expressionsvektor überprüft (B2.1.2).

PRIMERNAME	PRIMERSEQUENZ (5'-3')	SCHMELZTEMPERATUR, LAGE IM GENOM
T7-f	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	T _m =56°C
PET-int-r	ACC CAT GAC CTT ATT ACC AAC CTC	T _m =70°C

Tabelle B.3 Primer zur Sequenzierung des Inserts in den Vektor pET21a-int. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: f, forward, r, reverse, T_m Schmelztemperatur.

B1.5 Plasmide

Als Standardisolat wurde die Sequenz der VP1-unique region aus dem Vektor pJB verwendet (Mori *et al.*, 1987). Alle in dieser Arbeit eingesetzten Proteinfragmente wurden zuvor in den Expressionsvektor pET21a-int kloniert, der freundlicherweise von Uli Schmidt (Universität Halle/Wittenberg) zur Verfügung gestellt wurde. Die Vektorkarte zeigt die Restriktionsenzymststellen NdeI und XmaI, über die das jeweilige Insert in den Vektor kloniert wurde.

LacI steht für das β -Galaktosidase Gen, T7 für den T7-Promotor, der zur Expression des gewünschten Genfragments eingesetzt wurde. INT_CHIT ist die Abkürzung für Intein-Chitin-Binde-Domäne. Diese wird fusioniert an den Carboxyterminus des gewünschten Proteinfragments synthetisiert und ist wichtig für die Aufreinigung über eine Chitin-Affinitätsmatrix. Als Selektionsmarker diente Ampicillinresistenz (AP). Der eingezeichnete Replikationsursprung (Ori) ist für die Replikation des Plasmids bei Bakterienzellteilung und damit die Vermehrung im *E. coli* System notwendig.

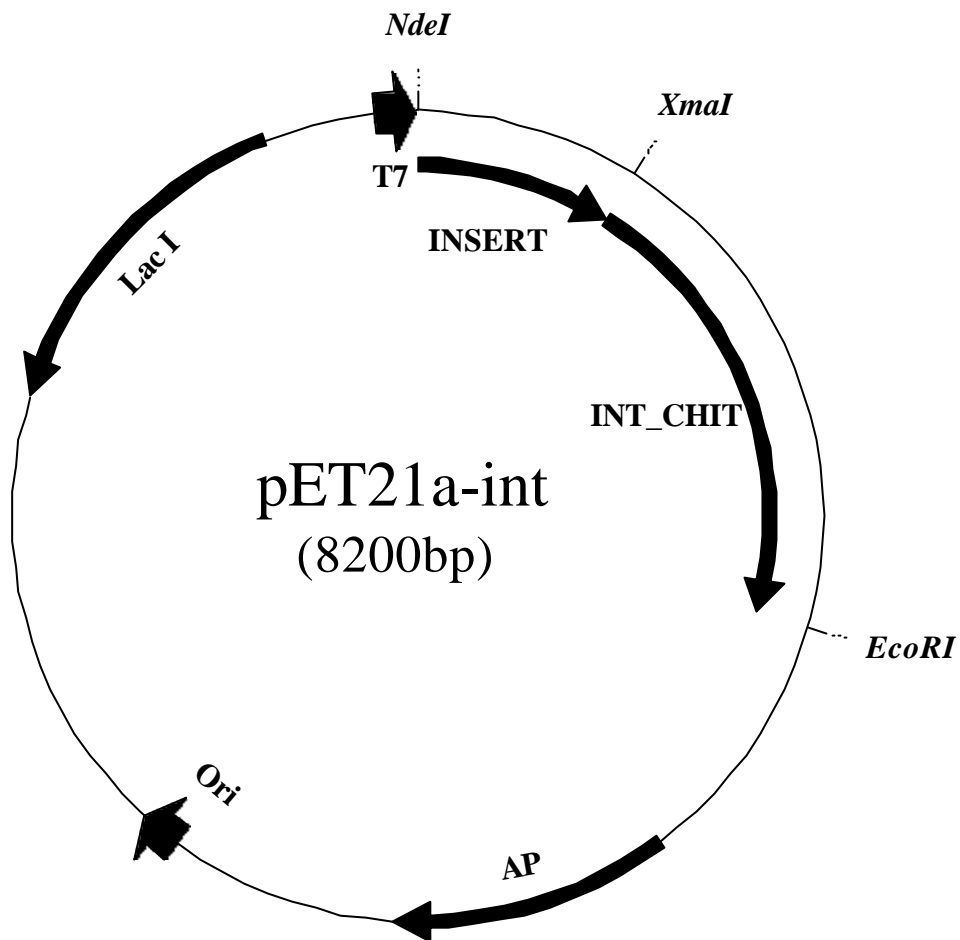


Abbildung B.1 Plasmidkarte des Expressionsvektors pET21a-int. Verwendete Abkürzungen sind LacI für β -Galaktosidase Gen, T7 für T7-Promotor, INT_CHIT für Intein-Chitin-Binde-Domäne und AP für Ampicillinresistenzgen. Das gewünschte Insert wurde mit den entsprechenden Primern aus Tabelle B.2 amplifiziert. Die Linkerregionen mit den Restriktionsenzymschnittstellen NdeI und XmaI wurden mit den entsprechenden Enzymen verdaut und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pET21a-int kloniert. Der Erfolg der Klonierung und die Sequenz des eingebauten Inserts wurde mit den Primern aus Tabelle B.3 bestätigt.

B2 Methoden

B2.1 Molekularbiologische Techniken

B2.1.1 Nested PCR

Parvovirus B19-DNS wurde durch eine nested PCR nachgewiesen, bei der die für die Proteine VP1- und VP2-kodierende Region mit folgenden Primern aus Tabelle B.1 amplifiziert wurde: VP1/VP2-np1-f und VP1/VP2-np1-b (erste Runde), VP1/VP2-np2-f und VP1/VP2-np2-b (zweite Runde) (Hemauer *et al.*, 1996).

Um die komplette VP1-unique region zu amplifizieren, wurde mit den Primerpaaren aus Tabelle B.1, VP1N-np1-f und VP1N-np1-b (erste Runde), VP1N-np2-f und VP1N-np2-b (zweite Runde) eine neue Version der nested PCR etabliert. Die Sequenz der Primer wurde nach der bereits veröffentlichten B19-Genomsequenz (Shade *et al.*, 1986) ausgewählt und die Primer von der Firma Metabion (München, Deutschland) synthetisiert.

Die Serumproben wurden mit dem gleichen Volumen an Wasser verdünnt und 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Aggregierte Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt. 2µl Aliquots wurden jeweils in die erste PCR-Runde eingesetzt. Von diesem Reaktionsansatz wurden wiederum 2µl für die zweite Runde verwendet. Die PCR-Parameter der ersten und zweiten Runde waren jeweils gleich. Die Virus-DNS wurde für 60 Sekunden bei 95°C hitzedenaturiert, um Sekundärstrukturen zu lösen. Danach ließ man die Primer für 60 Sekunden bei 55°C an die einzelsträngige Virus-DNS hybridisieren. Das gewünschte Genfragment wurde für 60 Sekunden bei 72°C durch die *Pwo*-Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland) polymerisiert und vermehrt. Vierzig PCR-Runden reichten für die Amplifizierung der für die VP1-unique region kodierenden Sequenz aus. Der Erfolg wurde durch Auftragen und Auftrennung von 10µl auf einem 2%-Agarosegel und Färben mit Ethidiumbromid überprüft. Banden mit einer Größe von 500 Basenpaaren zur Amplifikation des VP1/VP2-kodierenden Bereiches und einer Größe von 950 Basenpaaren für die Sequenz der VP1-unique region konnten als positiv gewertet werden.

B2.1.2 Sequenzanalyse

Die Amplifikationsprodukte der nested PCR wurden mittels QIAquick spin columns von Qiagen (Hilden, Deutschland) gereinigt. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen konnten über einen 373A Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und Einsatz der bereits beschriebenen Primer (Tabelle B.1 bzw. Tabelle B.2) erhalten werden. Die Nukleotidsequenzen der für die VP1-unique region kodierenden Genomabschnitte von den einzelnen Virusvarianten sind in der GenBank unter folgenden Nummern abzurufen: AF293862-293881.

B2.1.3 Klonierungen

Die Genabschnitte der VP1-unique region, Standard pJB (Mori *et al.*, 1987) und Virusvarianten, ebenso wie verkürzte Abschnitte VP1N-A und VP1N-B wurden mit den Primern aus Tabelle B.2 vervielfältigt und über die Restriktionsenzymststellen *NdeI* und *XmaI* in den T7 Expressionsvektor pET21a-int (Uli Schmidt, Institut für Biotechnologie, Universität Halle-Wittenberg, Deutschland) kloniert (Abbildung B.1). Die PCR-Parameter für die Amplifizierung: 60 Sekunden bei 95°C (Hitzenaturierung), 60 Sekunden bei 53°C (Hybridisierung), 60 Sekunden bei 72°C (Amplifizierung des gewünschten Gens). Die Integration der Fragmente in den Vektor wurde zunächst über Kolonie-PCR und Gen-Analyse überprüft. Im Anschluß daran wurde über Sequenzanalyse mit den Primern aus Tabelle B.3 die korrekte Sequenz der Klonierungsstellen bestätigt.

B2.2 Proteinchemische Techniken

B2.2.1 Reinigung der VP1-unique region und verkürzter Fragmente

Die Expression und Reinigung der VP1-unique region und ihrer verkürzten Abschnitte, VP1N-A und VP1N-B, erfolgte über ein Intein-Chitin System. Dabei wird das gewünschte Protein als Fusionsprotein zusammen mit einem modifiziertem Intein (50kD) aus *Saccharomyces cerevisiae* und einer Chitin-Binde-Domäne (5kD) aus *Bacillus circulans* am Carboxyterminus synthetisiert. Die eigentliche Reinigung erfolgte

über Bindung des Fusionsproteins an eine Chitin-Matrix über den Anteil der Chitin-Binde-Domäne. Das gewünschte Proteinfragment wird über ein Sulfhydrylreagenz wie z.B. DTT (Dithiothreitol) oder Cystein vom Fusionsanteil (Intein und Chitin-Binde-Domäne) gespleißt und in nativem Zustand von der Säule eluiert.

Die klonierten Konstrukte wurden in den *E. coli* Stamm BL21 (DE3) transformiert. LB-Medium (luria broth) mit 100µg/ml Ampicillin als Selektionsmarker wurde mit den Bakterien im Schüttler bei 220 RPM und 37°C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7–0,9 wurde die Synthese des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) induziert. Nach drei Stunden wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet und in 30ml einer 20mM HEPES-NaOH, 1mM EDTA (Ethylendiaminetetraacetylal), 100mM NaCl, pH 8,5-Lösung resuspendiert. Die Proteinsynthese wurde durch SDS-Page kontrolliert, der entweder eine Silberfärbung oder ein Western Blot mit polyklonalem Kaninchenserum gegen die VP1-unique region folgte. Die Bakterienzellen wurden mittels einer *French Press* aufgeschlossen und die Zelltrümmer bei 10000g pelletiert. Der Überstand wurde unter Verwendung einer FPLC-Anlage (Pharmacia Biosystems, Uppsala, Schweden) auf eine Chitinsäule (New England Biolabs, Beverly, USA) geladen. Die Säule wurde mit zwei Volumina 20mM HEPES-NaOH, 1mM EDTA, 100mM NaCl, pH 8,5-Puffer, acht Volumina 20mM HEPES-NaOH, 1mM EDTA, 2mM NaCl, pH 8,5-Puffer und zwei Volumina 20mM HEPES-NaOH, 1mM EDTA, 100mM NaCl, pH 8,5-Puffer gewaschen. Die Spleißreaktion wurde durch Waschen mit drei Volumina eines 20mM HEPES-NaOH, 1mM EDTA, 100mM NaCl, pH 8,5-Puffers versetzt mit 50mM DTT über Nacht bei 4°C induziert. Mit drei Volumina 20mM HEPES-NaOH, 1mM EDTA, 100mM NaCl, pH 8,5-Puffer konnte das gewünschte Protein eluiert werden. Die Fraktionen wurden durch SDS-Page und Silberfärbung auf Reinheit und Menge getestet. Positive Fraktionen wurden gesammelt, vereint und über ein Centriplus Röhrchen (3kD Ausschlußgröße, Amicon, Bedford, USA) konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde nach Dialyse gegen PBS (0,9M KH₂PO₄, 8,0mM Na₂HPO₄, 2,7mM KCl, 137mM NaCl) über einen Bradford Assay (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt.

B2.2.2 Herstellung virusähnlicher B19-Partikel

Nicht-infektiöse VP2- und VP1/VP2-Kapside wurden freundlicherweise von Bärbel Kaufmann (Universität Potsdam, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Expression wurde in einem Baculovirus Expressionssystem durchgeführt. Die rekombinanten

Baculoviren wurden durch ein Bac-to-Bac System (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) mit einem pFast Bac DUAL Vektor erzeugt. Die Kapside wurden über Ultrazentrifugation in einem Cäsiumchloridgradienten gereinigt.

B2.2.3 Western Blot

Die Proteine wurden durch Western Blot Analyse auf Reinheit und Größe getestet. Dabei wurden die Proteine über SDS-Page aufgetrennt und über Elektrottransfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin *et al.*, 1979). Protein-freie Regionen wurden mit einer 5%-igen Magermilchlösung in Trispuffer, pH 7,5 abgesättigt und über Nacht bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper, Kaninchenserum gegen die VP1-unique region, in einer 1:500 Verdünnung inkubiert. Der zweite Antikörper zur Detektion der gewünschten Proteinbanden (alkalische Phosphatase konjugierter Antikörper aus Schwein gegen Kaninchen IgG) wurde in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt (Bio-Rad, München, Deutschland). Die Membran wurde mit NBT (Nitroblautetrazolim) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat) (Roche, Mannheim, Deutschland) in 0,1M Tris, 0,05M $MgCl_2$, 0,1M NaCl, pH 9,5 gefärbt.

B2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Humane, monoklonale Antikörper und Kaninchenserum wurden hinsichtlich ihres Gehalts an VP1N-spezifischen Antikörpern im ELISA getestet. Die Mikrotiterplatten wurden mit rekombinanten Proteinen (100ng je Napf), die in einem 0,2M Carbonatpuffer, pH 9,5 verdünnt wurden, beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Platten wurden eine Stunde bei 37°C mit einer 2%-igen BSA-Lösung abgesättigt und für 1,5 Stunden bei 37°C mit dem ersten Antikörper inkubiert (1:500-Verdünnung bei Kaninchenserum, 1:1000-Verdünnung bei humanen, monoklonalen Antikörperüberständen). Nach dreimaligem Waschen mit PBS, 0,05% Tween wurde für 1,5 Stunden bei 37°C mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Je nach Bedarf wurde anti-human IgG (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) oder anti-Kaninchen IgG (Bio-Rad, München, Deutschland) in einer 1:2000 Verdünnung eingesetzt. Nach dem letzten Waschschrift wurde mit Färbelösung (p-Nitrophenylphosphat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA in 10% Diethanolamin) für eine halbe Stunde im Dunkeln inkubiert. Die OD_{405} wurde in einem SLT Spectra Photometer für Mikrotiterplatten bestimmt.

B2.3 Biosensormessungen

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der humanen, monoklonalen Antikörper (die gegen die VP1-unique region gerichtet sind) zu der VP1-unique region der einzelnen Virusvarianten wurde ein Schwingquartzbiosensor AFFco 20 eingesetzt, der vom Fraunhofer-Institut für Festkörpertechnologie München, Deutschland zur Verfügung gestellt wurde (Köblinger *et al.*, 1992). Er basiert auf einem Fließinjektionssystem, einer peristaltischen Pumpe und Quarzkristallen mit Goldelektroden. Die Eigenfrequenz des Schwingquartzes (ca. 20MHz) wird über die Goldelektroden elektrisch übertragen (piezoelektrische Schwingungen) und kann am Bildschirm direkt visualisiert werden. Der Quartz schwingt so lange in seiner Frequenz, bis Masseänderungen an der Quarzoberfläche zu einer Frequenzänderung führen. Durch das Fließinjektionssystem kann diese Masseänderung zeitgleich am Bildschirm verfolgt werden. Dabei ist die Frequenzänderung am Quartz kein Maß für die gebundene Masseänderung. Jedoch kann man aus den erhaltenen Kurven für die Assoziations- und Dissoziationskinetik die Werte für die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} bestimmen. Aus diesen läßt sich der Wert für die Dissoziationskonstante über die Formel $K_D = k_{off} / k_{on}$ berechnen.

Zur Aktivierung der Goldelektroden wurden diese mit Dithiobissuccinimidyl-Propionat bei einer Konzentration von 0,4% in DMSO (Dimethylsulfoxid) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit PBS, pH 7,4 gewaschen. Protein A-Lösung (1mg/ml) wurde an den Quartz gekoppelt und an diese die Antikörper (0,5mg/ml). Nach Waschen mit PBS und Einsetzen des Quartzes in die Halterung konnten die einzelnen Proteinvarianten in einer Konzentration von 1µM in das Fließinjektionssystem eingespritzt, und die Kinetik direkt am Bildschirm verfolgt werden. Vor dem Einspritzen des Antigens wurden jeweils mit einer 0,025%-igen BSA-Lösung unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Assoziations- und Dissoziationskinetiken wurden mit dem Programm Origin version 5,0 (Microcal Software Inc.) gefittet.

B2.4 Spektroskopische Methoden

B2.4.1 UV/VIS-Spektroskopie

Proteine absorbieren im UV/VIS-Spektrum über ihre Peptidbindungen (180-240nm) bzw. über ihre aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan (250-300nm). Die Absorptionsspektren wurden mit einem Uvikon 930 UV/VIS-Spektrophotometer (Kontron Instruments, München, Deutschland) im Bereich von 220 bis 320nm bei einem Wellenlängenbereich von 200nm/min und einem Anregungsspalt von 2nm Bandbreite in Quartzküvetten (Hellma, Müllheim/Baden, Deutschland) mit 1cm Schichtdicke aufgenommen. Die Spektren wurden gegen Puffer korrigiert. Zur Bestimmung der Konzentration neben der bereits erwähnten Bradford-Methode wurde der Extinktionskoeffizient der einzelnen Proteinfragmente (VP1N, VP1N-A und VP1N-B) über die Methode nach Gill und von Hippel (Gill und von Hippel, 1989) bestimmt.

Im Unterschied zur Proteinbestimmung mittels Bradford ist die Bestimmung über den Extinktionskoeffizienten sensitiver, jedoch stört DTT, welches bei der Proteinelution eingesetzt wird, erheblich. Das Protein mußte vor der Konzentrationsbestimmung in den jeweiligen Puffer ohne DTT oder EDTA dialysiert werden.

Über das Lambert-Beer'sche Gesetz konnte die Konzentration der Proteinlösungen ermittelt werden:

$$E_{280} = \epsilon \times c \times d;$$

E_{280} : Extinktion bei 280nm

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient [cm^2/mol]

c: Proteinkonzentration [mol/l]

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

PROTEIN	EXTINKTIONSKOEFFIZIENT ϵ [M ⁻¹ CM ⁻¹]	MOLEKULARGEWICHT [G/MOL]	LÄNGE [ÅS]
VP1N	29870	25511	230
VP1N-A	13370	14805	138
VP1N-B	16500	13625	120

Tabelle B.4 Extinktionskoeffizient und Molekulargewicht der Proteinfragmente. Berechnet wurde nach der Formel $\epsilon = a \times 1280 + b \times 5960$, wobei für die Variable a die Anzahl an Tyrosinresten eingesetzt wurde und für b die Anzahl an Tryptophanresten (Gill und von Hippel, 1989). Cysteinreste gehen in die Berechnung normalerweise mit ein, die VP1-unique region besitzt jedoch keine.

B2.4.2 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektren geben Einblick über die strukturelle Umgebung der im Protein enthaltenen aromatischen Aminosäuren. Dabei besitzen die einzelnen Aromaten unterschiedliche Gewichtung auf ein Fluoreszenzspektrum. Die relativen Empfindlichkeiten sind 1100 (Tryptophan): 200 (Tyrosin) :8 (Phenylalanin) (Schmid, 1997). Wie die Daten zeigen, besitzt Tryptophan den höchsten Anteil an Empfindlichkeit und damit die größte Gewichtung am Fluoreszenzspektrum. Die Aminosäuren absorbieren Lichtquanten, werden dabei angeregt und emittieren Licht im längerwelligen Bereich. Je nach Umgebung werden sie gequencht. Das heißt, die Energie wird nicht in Form von Licht abgegeben, sondern an umgebende reaktive Gruppen, dadurch wird die Fluoreszenzintensität im Spektrum abgesenkt.

Alle Fluoreszenzspektren wurden mit einem FluoroMAX II-Spektrofluorimeter mit temperierbarem Küvettenhalter (Spex Industries, Edison, USA) in einem Bereich von 300-400nm aufgenommen. Der Wellenlängenvorschub betrug 100nm/min, die Anregungswellenlänge 280 bzw. 295nm bei einer Bandbreite von 5nm (Exzitations- und Emissionsspalt). Gemessen wurde in 1ml Quartzküvetten (Hellma, Müllheim/Baden, Deutschland) bei 25°C. Die Spektren wurden gegen Puffer korrigiert. Alle Messungen wurden in einem 10mM Trispuffer pH 8,5 durchgeführt.

B2.4.3 Circular Dichroismus-Spektroskopie

Beim Circular Dichroismus (CD) wird je nach Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes zwischen Nah-UV (180-250nm) und Fern-UV (250-350nm) unterschieden. Das Nah-UV-Spektrum, bei dem vorwiegend die aromatischen Aminosäuren absorbieren, gibt Aufschluß über die charakteristische Tertiärstruktur des jeweiligen Proteins. Das Fern-UV-Spektrum, bei dem in erster Linie die Peptidbindungen (die Carbonylgruppen) absorbieren, liefert hingegen Hinweise über die Sekundärstrukturanteile im Protein. Dabei gibt es für α -Helix, β -Faltblatt und Random Coil-Strukturen Vergleichsspektren, anhand deren Anteile im Protein prozentual berechnet werden können. In dieser Arbeit wurde für die Berechnung der Sekundärstrukturanteile das Programm von Dr. Gerald Böhm (Universität Halle/ Wittenberg) verwendet. Die Berechnungen können nur als theoretische Annäherung an die eigentliche Struktur verstanden werden, sie liefern keinerlei Hinweise auf die genaue Lage der jeweiligen Sekundärstrukturanteile.

Die CD-Spektroskopie wurde mit einem Aviv Spektropolarimeter 62 DS (Aviv Instruments Inc., Lakewood, USA) durchgeführt. Die Nah-UV Spektren wurden in dieser Arbeit vernachlässigt, da die Struktur der VP1-unique region bisher unbekannt ist und dadurch Vergleichsspektren fehlen. Fern-UV-Spektren wurden in einem Bereich von 190-260nm aufgenommen bei einem Wellenlängenvorschub von 30nm/min und einer Bandbreite von 1nm in 1mm Quartzküvetten (Hellma, Müllheim/Baden, Deutschland) bei 25°C.

Die molare Elliptizität Θ ist bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren und wird als quantitatives Maß für die Ausprägung von Sekundärstruktur herangezogen (Schmid, 1997).

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot M_{MRW}}{10 \cdot c \cdot d}$$

Θ_{MRW} : Elliptizität der Aminosäuren [Grad cm²/dmol]

M_{MRW} : Molekulargewicht [g/mol]

Θ : gemessene Elliptizität [Grad]

c : Konzentration der Proteinlösung [mg/ml]

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

Alle Messungen wurden in einem 10mM Trispuffer, pH 8,5 aufgenommen und gegen Puffer korrigiert.

B2.5.4 Phospholipase A2-Assay

Zum Nachweis einer Phospholipase A2 gibt es verschiedene Möglichkeiten. Es gibt synthetische Substratanaloga, deren Enzymspaltung spektroskopisch über Fluoreszenz- oder UV/VIS-Spektroskopie verfolgt werden kann. Desweiteren können Phospholipide in Liposomen oder *E. coli* Membranen radioaktiv markiert und ihre Spaltung durch Autoradiographie visualisiert werden. Beide Methoden haben sowohl Vor- als auch Nachteile. Die synthetischen Substratanaloga sind in der Regel nicht sehr stabil und ihre Sensitivität ist niedrig. Autoradiographie ist eine sehr sensitive Methode, erlaubt jedoch keinerlei Quantifizierung.

Für unsere Zwecke wurde deshalb nach einer alternativen Methode gesucht. Die methodische Weiterentwicklung im letzten Jahrzehnt vor allem in der Massenspektrometrie erlaubt immer breitere Anwendungsmöglichkeiten. So können über einen MS/MS-Scan im Gegensatz zum althergebrachten einfachen MS-Scan spezifisch bestimmte Produkte detektiert werden. Dies setzt das Hintergrundrauschen extrem herab und ist somit eine sehr sensitive und einfach zu handhabende Methode. In Zusammenarbeit mit Dr. Gerhard Liebisch und Dr. Wolfgang Drobnik aus dem Institut für klinische Chemie (Universität Regensburg) wurde eine Methode zum Nachweis der Phospholipase A2-Aktivität in Parvovirus B19 entwickelt. Die Reaktionsmischung setzte sich aus 100µl einer Suspension aus Phospholipidliposomen zusammen, die 25 bzw. 50nmol an β -Arachidonyl- γ -Stearoyl-Phosphatidylcholin in 10mM Trispuffer, pH 8,5 enthielten. 10mM Calciumchlorid und 1 bzw. 2µM Protein wurde je nach Reaktionsansatz zugegeben. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Methanol/Chloroform 2:1 (v,v) gestoppt. Die Lipidextraktion erfolgte nach der Methode von Bligh and Digher (Bligh und Dyer, 1956).

Die getrockneten Lipidextrakte wurden in 10mM Ammoniumformiat/Chloroform(1:3)-Lösung in Methanol gelöst und über ESI-MS/MS-Spektrometrie charakterisiert. Die Messungen in einem *Micromass Quattro LC Triple* Quadrupol Massenspektrometer (Manchester, UK) fanden unter folgenden Einstellungen statt: Kapillare 3,5kV, Kollisionsenergie 24V und Kollisionsgasdruck $1,3 \times 10^{-3}$ Torr. Die Proben wurden mit einer konstanten Fließrate von 75µl/min mit einer *Waters Alliance 2790* (Mildford, MA, USA) eingespritzt und durch einen *parent scan* von m/z 184 spezifisch für

Phosphocholin enthaltende Lipide analysiert (Brugger *et al.*, 1997). Die Phospholipase A2-Aktivität wurde als Intensitätsverhältnis von γ -Stearoyl-Lysophosphatidylcholin zu β -Arachidonyl- γ -Stearoyl-Phosphatidylcholin ausgedrückt.

C Ergebnisse und Diskussion

C1 Allgemeines

Schon seit längerem besteht die Frage, wie Parvovirus B19 unterschiedliche B19-assoziierte Krankheitsmanifestationen verursacht? Diese äußern sich unter anderem im allseits bekannten *Erythema infectiosum*, Arthritiden und Arthralgien, Spontanaborten und *Hydrops fetalis*, Thrombo- und Granulozytopenien, lassen sich jedoch durch den extrem hohen Zelltropismus des Virus für erythroide Vorläuferzellen nicht erklären. Der Virusrezeptor Globosid befindet sich zusätzlich zu den Erythrozytenvorläuferzellen auch auf Megakaryozyten, Endothelzellen und Synovialzellen, dagegen konnte eine erfolgreiche Virusreplikation nur in erythroiden Vorläuferzellen bzw. in Zellen der fötalen Leber nachgewiesen werden. Als möglicher Faktor für die Entstehung von B19-assoziierten Krankheitssymptomen wurde in den letzten Jahren häufiger die VP1-unique region diskutiert (Abbildung C.1). Diese Proteindomäne ist auf dem Kapsid nach außen exponiert und besitzt daher sehr viele Epitope, gegen welche neutralisierende Antikörper gerichtet sind. Aufgrund des hohen Selektionsdruckes ist die Region im Gegensatz zu den anderen B19-Proteinen, dem VP2- und dem NS1-Protein, auf Aminosäureebene hoch variabel. Da die Bindung an Globosid über Proteinstrukturen an der Dreifachsymmetrieachse im Kapsid, gebildet aus VP2-Proteinen nicht der alleinige Faktor für den hohen Zelltropismus sein kann (Abschnitt A2), könnte die VP1-unique region, die vermutlich an der Fünffachsymmetrieachse exponiert vorliegt, geeigneter Kandidat für die Bindung an einen noch nicht-identifizierten Ko-Rezeptor sein. Diese

Hypothese konnte durch Experimente mit *Minute Virus of Mice* verstärkt werden, bei denen gezeigt wurde, daß VP2-Kapside ohne den VP1-Anteil nicht infektiös sind (Willwand und Hirt, 1993). *Minute Virus of Mice* besitzt eine Sequenzhomologie von 50% zum Genom von Parvovirus B19 und zeigt bei der Virusreplikation und Transaktivierung seines Promotors durch das virale Nichtstrukturprotein NS1 viele Parallelen zu Parvovirus B19 (Shade *et al.*, 1986). Um die Rolle der VP1-unique region bei der zelltypspezifischen Bindung und den eventuell damit verbundenen Krankheitsmanifestationen einer B19-Infektion zu untersuchen, wurde sie in dieser Arbeit sowohl auf DNS- als auch auf Protein-Ebene charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde neben der DNS-Sequenzierung der VP1-unique region von Virusisolaten aus Patienten mit unterschiedlichen Krankheitssymptomen ein Proteinreinigungssystem etabliert, um daraus abgeleitete Aminosäureaustausche in der Region im Hinblick auf Affinitätsänderungen zu einem humanen, monoklonalen Antikörper, der neutralisierende Eigenschaften besitzt, und Konformationsänderungen in der VP1-unique region zu untersuchen. Außerdem sollte eine in der VP1-unique region vermutete Phospholipase A2 experimentell untersucht und mit B19-assoziierten Krankheitsbildern korreliert werden.

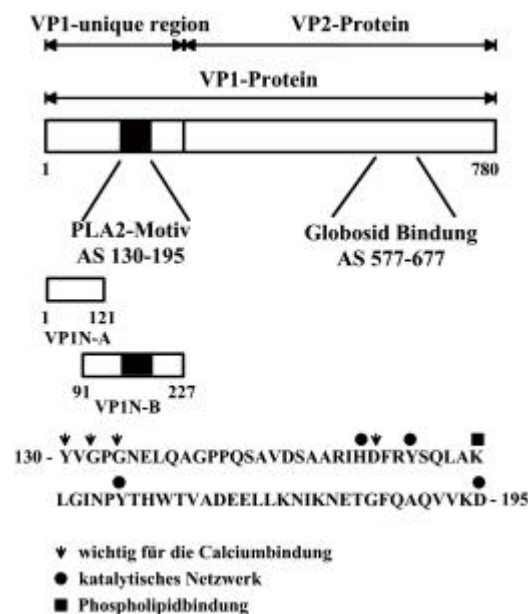


Abbildung C.1 Lage der VP1-unique region. Die viralen Strukturproteine VP1 und VP2 sind bis auf einen aminoterminalen Bereich von 227 Aminosäuren identisch. Dieser wird als VP1-unique region bezeichnet. Im carboxyterminalen Teil der VP1-unique region zwischen den Aminosäuren 130 und 195 befindet sich das Motiv für das aktive Zentrum einer Phospholipase A2. Im VP2-Protein vermutet man die Bindung des viralen Zellrezeptors Globosid an einen Bereich zwischen den Aminosäuren 577 und 677 (Chipman *et al.*, 1996).

C2 Produktion der VP1-unique region in *E. coli* und Reinigung

Um den Einfluß natürlich vorkommender Aminosäurevariationen auf die Proteinkonformation zu untersuchen, wurde die Domäne der VP1-unique region des Protoyp Isolates pJB (VP1N-pJB) im *E. coli* System über das Impact T7 System (New England Biolabs, Beverly, USA) produziert. Der Genabschnitt der VP1-unique region wurde über PCR amplifiziert und an ein heterologes Konstrukt bestehend aus dem Gen einer modifizierten vakuolaren Membran ATPase Untereinheit I (VMA-I)-Intein (*Saccharomyces cerevisiae*) und einer Chitin-Binde-Domäne (CBD; *Bacillus circulans*) fusioniert. Dieses Konstrukt wurde in den Vektor pET21a-int kloniert. Nach Induktion mit 1mM IPTG wurde das Fusionsprotein, bestehend aus der VP1-unique region, Intein und CBD mit einem Molekulargewicht von 85kD synthetisiert und positive Klone über Western Blot Analyse mit einem humanen, monoklonalen Antikörper gegen die VP1-unique region identifiziert (Abbildung C.2). Die Reinigung erfolgte über Chitin-Affinitätschromatographie. Die Zugabe von DTT als reduzierendes Agens führte zur Abspaltung des aminoterminalen Teils des Fusionsproteins, also der VP1-unique region. Die VP1-unique region konnte eluiert werden (Abbildung C.2), während der Intein-CBD Anteil an der Chitin-Matrix gebunden blieb. Das DTT wurde über Dialyse vom Protein entfernt.

Das erhaltene Protein ist bis auf zwei ko-eluierte Proteinfragmente bei ca. 55 und 70kD sauber (Abbildung C.2). Die 70kD-Bande wird von den humanen, monoklonalen Antikörpern nicht im Western Blot erkannt und spielt daher bei zukünftigen Affinitätsmessungen keine Rolle. Das ko-eluierte Fragment bei ca. 55kD wird zwar im Western Blot erkannt, ist jedoch im silbergefärbten Gel in verschwindenden Mengen vorhanden. Es handelt sich dabei nicht um das Inteinfragment, obwohl es in etwa auf gleicher Höhe läuft, wird aber in Spur 3 nicht vom Antikörper erkannt.

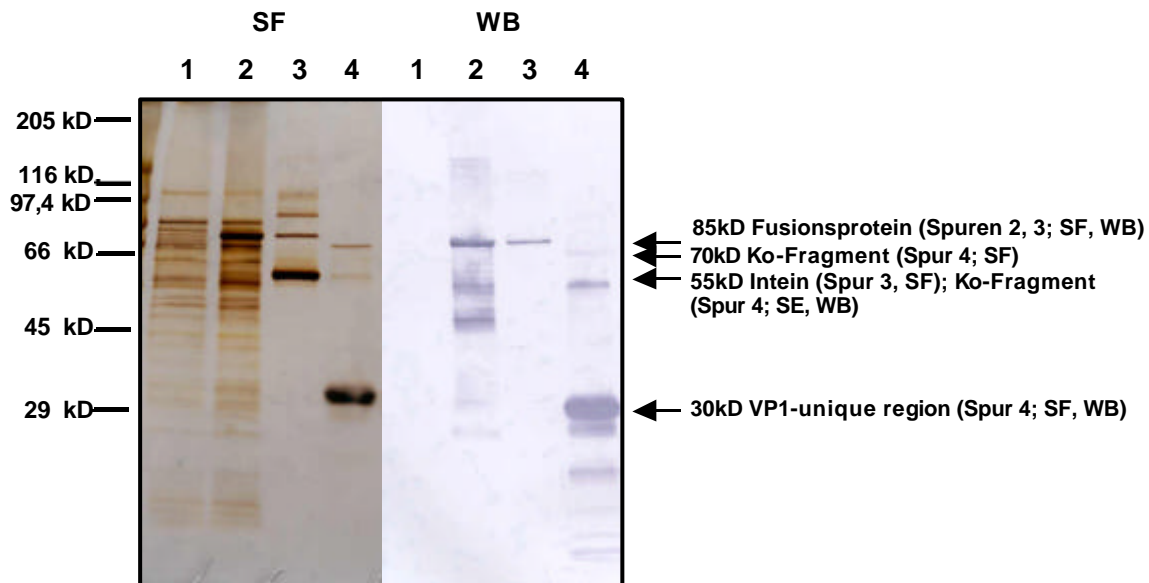


Abbildung C.2 Reinigung der VP1-unique region über Chitin-Affinitätschromatographie. Die VP1-unique region wurde als Intein-Chitin-Binde-(CBD)Domäne Fusionsprotein in einem *E. coli* Expressionssystem synthetisiert. Die Spuren 1 und 2 enthalten uninduzierte und mit IPTG induzierte Bakterien, die das Fusionsprotein VP1N-pJB mit Intein und CBD produzieren. Das exprimierte Protein wurde über Silberfärbung (SF) und Western Blot (WB) mit einem VP1-spezifischen humanen monoklonalen Antikörper bei einer Bande von 85kD entdeckt. Nach der Reinigung über eine Chitin-Matrix in einem FPLC-System wurde die VP1-unique region von dem modifizierten Intein (Spur 4) durch Zugabe von DTT gespleißt. Das eluierte Protein konnte auf einer Bandenhöhe von ca. 30kD ausgemacht werden (siehe Pfeil). Das immer noch gebundene Fusionsprotein, bestehend aus Intein und CBD kann von der Säule über die Zugabe von 1% SDS regeneriert werden, es läuft dabei auf einer Höhe von 55kD (Spur 3). Die VP1-unique region wurde gegen PBS dialysiert, um das DTT vom Carboxyterminus der VP1-unique region zu entfernen.

Ein entscheidender Vorteil des Intein-Systems ist die Tatsache, daß das Protein unter schonenden Bedingungen in nativem Zustand gereinigt und eluiert werden kann. Für die Reinigung ist kein Linker am amino- oder carboxyterminalen Ende notwendig, der die konformationelle Faltung und das funktionelle Verhalten eines Proteins negativ beeinflussen könnte. Ein Nachteil des *E. coli* Systems im allgemeinen ist die leichte Bildung von *Inclusion Bodies*, so auch in unserem Fall. Da 90% des exprimierten Proteins in *Inclusion Bodies* ausfielen, waren die Proteinausbeuten sehr gering (nicht gezeigt). Weder Induktion der *E. coli* Zellen über Nacht bei 15°C, noch Zugabe von Stabilisatoren wie z.B. Saccharose konnte die Menge an *Inclusion Bodies* herabsetzen. Eine Renaturierung mit den gebräuchlichen Methoden, wie Denaturieren mit 8M GdmCl und Dialysieren gegen Renaturierungspuffer, allmählich oder schockweise,

zeigte ebenfalls keinen Erfolg. Die Reinigung wurde soweit optimiert, daß aus einem Liter *E. coli* Kultur die Menge von 0,3mg Protein erhalten wurde, mit dem weitere Experimente durchgeführt werden konnten. Ein weiterer Grund für die schlechten Expressionsraten ist vermutlich die Tatsache, daß die VP1-unique region die Aktivität einer Phospholipase A2 besitzt, die in der Lage ist, Phospholipide in Zellmembranen zu spalten.

Ein großer Nachteil des *E. coli* Expressionssystems besteht darin, daß in diesem kaum posttranslationale Modifikationen der Proteine stattfinden. Es ist zwar bei den viralen Proteinen von Parvovirus B19 nicht bekannt, daß sie über den sekretorischen Weg in den Golgi-Apparat gelangen und dort z.B. durch das Anhängen von Zuckern posttranslational verändert werden, da man bisher kein entsprechendes Signalpeptid entdecken konnte. Daher erscheinen Glykosylierungen des Proteins eher unwahrscheinlich. Andererseits sind bei Phospholipasen A2 Modifizierungen bekannt, wie z.B. Transglutaminierungen, Acetylierungen von Lysinresten oder Phosphorylierung durch Proteinkinase C, die an der äußeren Zellmembran und nicht im Golgi-Apparat stattfinden und bei der Regulation der VP1-unique region im Signaltransduktionsweg eine entscheidende Rolle spielen könnten. Um größere Mengen an VP1-unique region zu erhalten und das Protein auf eventuell vorhandene posttranslationale Modifikationen untersuchen zu können, wurde nach einem alternativen Expressionssystem gesucht. Als Alternativsystem bot sich die Expression in dem eukaryotischen System Hefe an. Zu diesem Zweck wurde die Expression des für die VP1-unique region kodierenden Genbereichs in *Pichia pastoris*, einem methylotrophen Hefestamm, und *Saccharomyces cerevisiae*, einer Bäckerhefe, unternommen (nicht gezeigt, Diplomarbeiten Jörg Hoffmann und Kerstin Zarniko). Neben diesen Expressionssystemen wurde auch ein Ansatz im Baculosystem mit SF9-Zellen gestartet, in dem die Expression der Strukturproteine, der VP1- und VP2-Proteine, bereits gezeigt wurde. Das Hefesystem hat gegenüber dem Baculosystem einige Vorteile aufzuweisen: es ist kostengünstiger und einfacher zu handhaben. Nach den entsprechenden Klonierungsarbeiten und Expression der VP1-unique region zeigte sich durch Western Blot Analysen, daß die VP1-unique region im Baculosystem synthetisiert wird, nicht jedoch in Hefe. Daß es sich nicht um einen Fehler bei der Klonierung handelte, konnte bei *Pichia pastoris* ausgeschlossen werden, da über Southern Blot Analyse die Rekombination des gewünschten Genfragments in das Hefechromosom nachgewiesen werden konnte, die Synthese des Proteins aber trotzdem

nicht möglich war. Ebenso konnte im *Saccharomyces cerevisiae* System zwar die Transformation des Vektors in die Hefezellen gezeigt werden. Der Nachweis der Synthese der VP1-unique region fiel jedoch negativ aus. Als Ursache könnte ein hemmender Bereich auf genetischer Ebene in Betracht kommen, der die Expression des Gens der VP1-unique region und auch des kompletten VP1-Proteins verhindert. Wahrscheinlicher ist ein posttranskriptionaler Regulationsmechanismus. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß ein 3' nicht-translatierter Bereich in den Transkripten für die Synthese der Strukturproteine seine eigene mRNS-Translation in nicht-permissiven Zellen verhindert (Pallier *et al.*, 1997). Zur Untersuchung der Funktion der VP1-unique region muß nun für zukünftige Experimente auf das Baculovirus Expressionssystem, in dem die Synthese der VP1-unique region erfolgreich ausfiel, zurückgegriffen werden. Vielleicht klärt sich dann auch die Frage, warum sich die VP1-unique region und auch das VP2- bzw. VP1-Protein systemabhängig exprimieren läßt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde nur *E. coli* exprimiertes Protein eingesetzt.

C3 Untersuchungen zur genetischen und antigenen Stabilität der VP1-unique region

Im Gegensatz zu anderen Viren ist das B19-Genom stark konserviert und besitzt eine Variabilität von nur 1-2% (Blundell *et al.*, 1987; Mori *et al.*, 1987; Hemauer *et al.*, 1996). Dies erklärt sich damit, daß das B19-Genom über die zelluläre DNS-Polymerase repliziert wird, die eine geringe Fehlerhäufigkeit besitzt. Nur wenige DNS-Austausche resultieren in einer veränderten Aminosäure, wobei sich die höchste Aminosäurevariabilität im Bereich der VP1-unique region und im carboxyterminalen Teil des NS1-Proteins befindet (Hemauer *et al.*, 1996). In den folgenden Abschnitten soll die VP1-unique region auf ihre genetische und antigene Stabilität untersucht werden.

C3.1 Variabilität - Aminosäuresequenz

Zu diesem Zweck wurde eine nested PCR neu etabliert, die die komplette, für die VP1-unique region kodierende Genomregion amplifizieren kann (Abbildung C.3). Die Primer wurden anhand der Genomsequenz des Isolates nach Shade (Shade *et al.*, 1986) gewählt und im Programm *Generunner* (Microsoft) auf mögliche *Hairpin*-Strukturen,

Dimerisierungen usw. getestet. Es wurden relativ lange Primersequenzen gewählt, die die Genauigkeit des amplifizierten Produktes gewährleisten sollten und weniger auf Sensitivität ausgerichtet waren. Die PCR der VP1-unique region wurde in der ersten und zweiten Runde mit jeweils gesonderten Primerpaare (Tabelle B.1, B2.1.1) ausgeführt. Nach Sequenzierung der PCR-Produkte wurden die DNS-Sequenzen über das Programm *EditSeq* (Microsoft) in ihre Aminosäuresequenz überschrieben und miteinander verglichen. Die Nukleotidsequenzen der für die VP1-unique region kodierenden Genomabschnitte von den einzelnen Virusvarianten sind in der GenBank unter folgenden Nummern abzurufen: AF293862-293881.

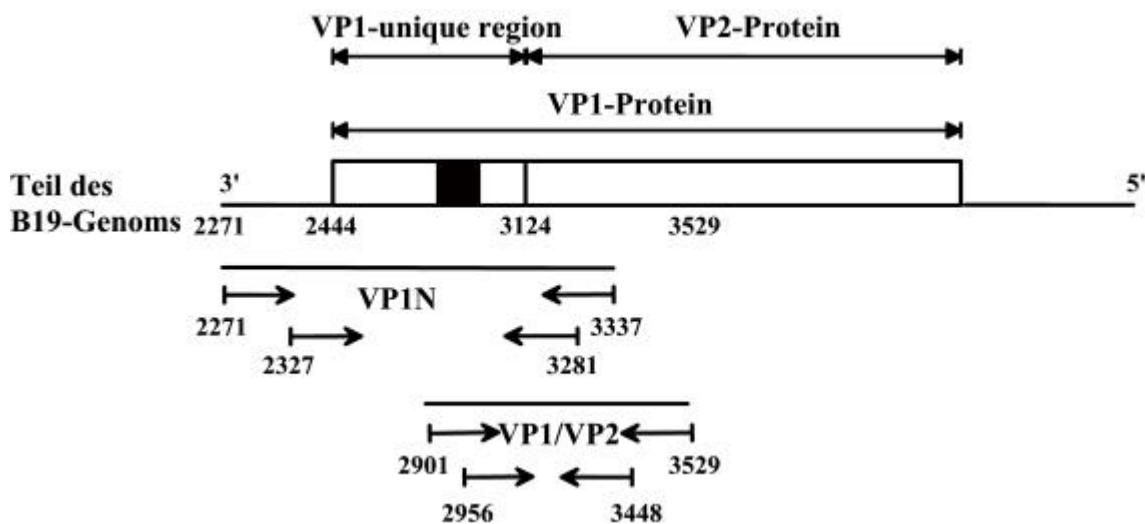


Abbildung C.3 Lage der Primer zur Amplifikation der VP1-unique region mittels nested PCR. Gezeigt ist die VP1-unique region im Gesamtkontext des VP2-Proteins und die Lage der Primer, die jeweils in der ersten und zweiten Runde der nested PCR zur Amplifikation der VP1-unique region als Genprodukt eingesetzt wurden.

Es wurden Genomsequenzen aus neun Virusisolaten von schwangeren Frauen mit einer akuten B19-Infektion (Patienten A bis I), aus fünf von Arthritispatienten (2_980728, 6_960625, (8_980219, 2_980414 und 7_980326) und aus zweien von Kindern mit einer chronischen B19-Infektion (Patienten J und 5940) charakterisiert.

Zwei der schwangeren Frauen hatten akute B19-Infektion ohne Symptome (Patienten A und B). Drei der Patienten entwickelten ein Exanthem bzw. zeigten Müdigkeit (Patienten C-E). Vier Isolate stammen von Patienten, bei denen sich *Hydrops fetalis* bzw. *Hydroenzephalopathie* beim Fötus entwickelte (Patienten F-I). In sechs Fällen konnten Sequenzen aus Fruchtwasserproben erhalten werden (B, D, E, F, H und I); in

drei dieser Fälle war das Virus ebenfalls im mütterlichen Serum nachzuweisen (E, G und H). In vier der Patienten (B, D, F und I) konnte keine Virus-DNS mehr im mütterlichen Serum über nested PCR nachgewiesen werden, obwohl die Fruchtwasserproben DNS-positiv waren. In zwei dieser Fälle (F und I) kam es zu *Hydrops fetalis* bzw. zu *Hydroencephalopathie*.

Nt Nr.	Nt	AS Nr.	AS	AU	pJB	A-S	C-S	D-FW	F-FW	G-S	G-FO	H-S	H-FW	I-FO	I-AS	J-S	5940-S	2_980728	6_960625	8_980219
2453	G	4	E->K	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2477	G	12	D->N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-
2493	A	17	K->R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-
2496	C	18	A->D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
2525/27	G/A	28	E->N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A/C	-	-	-
2527	A	28	E->D	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	C	C	-	-	-	-	-
2531	G	30	V->L	-	-	-	-	-	C	-	-	C	C	-	-	-	-	-	-	-
2560	A	39	Q->H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-
2570	G	43	D->N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-
2595	A	51	N->H	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2654	A	71	K->Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-	-
2693	C	84	H->Y	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T
2736	G	98	S->N	-	-	-	-	-	A	-	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-
2744	G	101	A->P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	-	-	-
2762	A	107	N->D	-	-	G	-	G	-	G	G	-	-	-	-	-	G	-	G	-
2803	A	120	Q->H	-	-	-	-	-	-	T	T	-	-	-	-	T	T	-	-	-
2810	G	123	V->L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-
2849	G	136	E->Q	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3008	C	189	Q->E	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3113	A	224	K->Q	-	-	-	-	-	-	C	C	-	-	-	-	C	-	-	-	-
3182	C	247	P->S	-	-	-	-	-	-	T	T	-	-	-	-	T	-	-	-	-
Anzahl der AS-Austausche:				1	1	1	1	1	2	5	5	2	2	1	1	5	8	1	1	1

Tabelle C.1 Aminosäureaustausche in der VP1-unique region von Parvovirus B19. Alle Aminosäuresequenzen wurden mit einer hypothetischen Konsenssequenz verglichen, die aus der optimalen Sequenz mit der niedrigsten Variabilität gebildet wurde. Die Nukleotidaustausche (Nt. Nr.) und die entsprechenden Aminosäureaustausche (AS. Nr.) werden in der Tabelle gezeigt. S, mütterliches Serum; FW, Fruchtwasser; FO, fötales Serum; AS, Aszites. Die folgenden Sequenzen zeigten keinerlei Aminosäureaustausche: B-FW, E-S, E-FW, I-FW, 2_980414 und 7_980326; kein Austausch im Vergleich zur Konsenssequenz.

Die Nukleotidsequenzen, die die für die komplette VP1-unique region und den Aminoterminus des VP2-Proteins kodierenden Bereich umfassen (Nt. 2444-3194; (Shade *et al.*, 1986)) wurden für alle Virusisolate bestimmt und in ihre Aminosäuresequenz umgeschrieben. Diese zusammen mit den Standardisolaten AU und pJB wurden mit einer hypothetischen Konsenssequenz verglichen, die aus allen Sequenzen gebildet wurde (Tabelle C.1). Die Variabilität schwankte zwischen 0% (Isolate B, E, 2_980414 und 7_980326) und 0,4% (ein Aminosäureaustausch; Isolate A, C, D, I, 2_980728, 6_960625, 8_980219, AU und pJB) bis zu 0,8% (zwei Aminosäureaustausche; Isolate F und H) und 2% (fünf Aminosäureaustausche; Isolate G und J). Die Sequenz von einem Kind mit chronischer B19-Infektion zeigte einen

höheren Grad an Variabilität (3,2% oder acht Aminosäureaustausche; Isolat 5940) (Hasle *et al.*, 1994). Der Vergleich der Virussequenzen aus den Isolaten der mütterlichen Seren mit denen aus den Fruchtwasserproben bzw. der Aszitesprobe zeigte keinerlei Proteinvariation bis auf das Isolat I, mit einem Austausch von 28E zu D in den Isolaten I-FO (fötales Serum) und I-AS (Aszites). Diese Mutation konnte jedoch nicht in der Fruchtwasserprobe (I-FW) beobachtet werden, sodaß sie vermutlich erst nach Infektion des Fötus entstand. Aminosäureaustausche, die mit einer Übertragung des Virus auf das ungeborene Kind oder mit der Entwicklung von *Hydrops fetalis* in Verbindung zu bringen sind, konnten nicht beobachtet werden.

In den Aminosäureregionen 28-136 und 189-247 war die Anzahl an Aminosäureaustauschen im Vergleich zu den anderen Bereich der VP1-unique region stark erhöht. Diese Bereiche könnten mit der Viruspathogenese assoziiert sein, da sie mit den Regionen überlappen, in denen sich sehr viele neutralisierende Epitope befinden (AS 16-99 und 142-211). In Bereichen, die auf der Viruskapsidoberfläche liegen und mit der Adsorption und dem Eindringen des Virus in seine Zielzellen assoziiert sind, befinden sich viele Epitope, an die neutralisierende Antikörper binden, um eine Infektion der Zellen zu verhindern. Als Antwort auf diese humorale Immunantwort ist das Virus in der Lage, aufgrund des ausgeübten Selektionsdruckes diesen Oberflächenbereich auf DNS- und geringerem Maße auf Proteinebene zu variieren. Durch Veränderung von Aminosäuren in besonders immunogenen Bereichen kann das Virus dem Immunsystem leichter entgehen. Bei unseren Sequenzierungen dominierten konservative Austausche, Aminosäure 12D zu N, 17K zu R, 28E zu N, 28E zu D, 30V zu L, 43D zu N, 107N zu D, 123V zu L, 136E zu Q und 189Q zu E. Gelegentlich konnten nicht-konservative Austausche festgestellt werden: Aminosäure 4E zu K, 18A zu D, 39 und 120Q zu H, 71 und 224K zu Q, 84H zu Y, 98S zu N, 101A zu P und 247P zu S. Die Mehrheit dieser nicht-konservativen Austausche wurden bei dem Isolat des chronisch infizierten Kindes (Isolat 5940) beobachtet. Dies deutet darauf hin, daß eine verlängerte Virusinfektion zu einem erhöhten Grad an Aminosäurevariabilität führen kann, wobei es sich dabei um einen Virusmechanismus handelt, dem Immunsystem zu entgehen.

In dieser Studie versuchten wir die Aminosäurevariabilität der VP1-unique region mit den einzelnen Krankheitsmanifestationen von B19 zu korrelieren. Bereits in früheren Publikationen konnte gezeigt werden, daß die Variabilität der VP1-unique region auf Aminosäureebene zwischen 0 und 1,7% lag (Erdman *et al.*, 1996). Die höchste

Variabilität wurde dabei in Isolaten von Patienten mit chronischen Infektionen und transienten aplastischen Krisen gefunden. Diese Ergebnisse stimmten mit denen von Hokynar *et al.* (2000) (Hokynar *et al.*, 2000) überein. In dieser Publikation wurde eine Variabilität der VP1-unique region auf Aminosäureebene beschrieben, die zwischen 1,2 (drei Aminosäuren) und 2,8% (sieben Aminosäuren) lag. Bei unseren Experimenten betrug die Variabilität der VP1-unique region zwischen 0 und 3,2% (acht Aminosäuren). Es ergab sich keine Korrelation zwischen einem bestimmten Aminosäureaustausch und einer speziellen Krankheitsmanifestation, z.B. *Hydrops fetalis* oder Übertragung des Virus auf den Fötus. Im Vergleich von Isolaten aus mütterlichem Serum mit jenen aus fötalem Serum oder Fruchtwasser konnte gezeigt werden, daß die Übertragung des Virus nicht mit Aminosäurevariationen assoziiert ist.

C3.2 Antikörper – Affinität über Biosensoren

Um zu untersuchen, ob Aminosäureaustausche zu Veränderungen in der Proteinkonformation der VP1-unique region führen, wurden Virusvarianten in den Vektor pET21a-int kloniert und über das eben beschriebene Impact T7 System der Firma New England Biolabs (Beverly, USA) synthetisiert und gereinigt. Folgende Virusvarianten (Abbildung C.4) wurden neben dem Standardisolat ausgewählt, als Int-Chit-Fusionsproteine exprimiert und im Western Blot getestet:

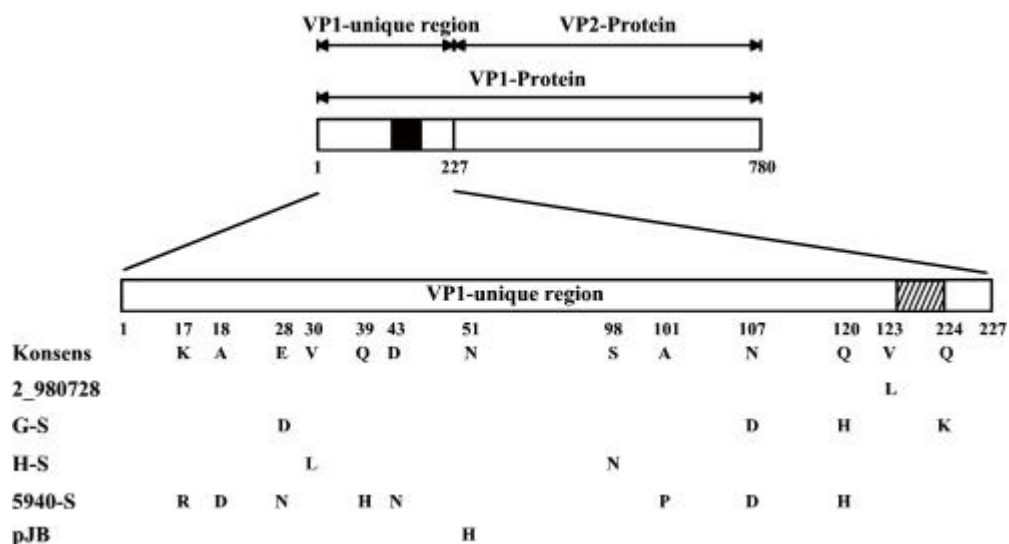


Abbildung C.4 Lage der Aminosäurevariationen innerhalb der VP1-unique region. Die Lage der Aminosäurevariationen innerhalb der VP1-unique region aus den Virusisolaten der Patienten 2_980728, G-S, H-S, 5940-S und des Standardtypisolates pJB im Vergleich zu einer Konsenssequenz, die aus allen Sequenzen mit dem geringsten Anteil an Variabilität gebildet wurde, sind in der Abbildung gezeigt.

Alle der aufgezählten Virusvarianten wurden im Western Blot sowohl vom VP1-spezifischen Kaninchenserum als auch von den humanen, monoklonalen Antikörpern, die beide gegen die VP1-unique region gerichtet sind, erkannt (nicht gezeigt). Das Epitop dieser humanen, monoklonalen Antikörper, welche in der Lage sind, das Virus *in vitro* zu neutralisieren (Gigler *et al.*, 1999) konnte auf die Aminosäuren 30-42 festgelegt werden (in Zusammenarbeit mit Markus Kohlmann und Prof. Michael Przybylski von der Universität Konstanz, Manuskript eingereicht). Dabei wurden die humanen, monoklonalen Antikörper an einer Sephadex Säule immobilisiert, diese wurde mit gereinigtem Protein VP1-unique region beladen und nach mehrmaligem Waschen in der Säule mit den Proteasen Endoproteinase AspN bzw. Trypsin gespalten. Nach Elution der abgedauten und nicht komplexierten Peptidfragmente wurden diese über Maldi-TOF Analyse charakterisiert. Weitere Experimente erfolgten über die Spaltung der VP1-unique region in Lösung und nachfolgender Bindung der Peptidfragmente an die auf der Säulenmatrix immobilisierten Antikörper. Die Analyse der Fragmente mittels Maldi-TOF ergab, daß die Epitopregion in der VP1-unique region innerhalb der Aminosäuren 30-42 zu finden ist. Die Lage dieses neutralisierenden Epitops deckt sich mit einem aus der Literatur bekannten zwischen den Aminosäuren 31 bis 51, welches anhand von Immunisierungs-experimenten mit Peptiden charakterisiert werden konnte (Saikawa *et al.*, 1993). Dieser kurze Abschnitt in der VP1-unique region wird offensichtlich von neutralisierenden Antikörpern erkannt, und diese können eine Virusinfektion verhindern (Gigler *et al.*, 1999). Anhand der Größe und Überlappung der gespaltenen Proteinfragmente ergaben sich Hinweise auf eine konformationellen Faltung im aminoterminalen Teil, die den Zugang der Proteasen erschwert hatte (Markus Kohlmann, persönliche Mitteilung). Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen aus Röntgenkristallographieexperimenten, die auf eine eher ungeordnete Struktur in der VP1-unique region hinweisen (Agbandje *et al.*, 1994).

Mit Hilfe von Schwingquartz-Biosensormessungen können feinste Unterschiede in der Bindung der monoklonalen Antikörper zu den Virusvarianten quantifiziert werden. Um die antigene Stabilität des identifizierten Epitopes näher zu charakterisieren, wurden zwei Isolate ausgewählt, bei denen bekannt war, daß sie Aminosäurevariationen im Bereich des Epitops der VP1-spezifischen Antikörper besitzen: Isolat G (28E zu D) und Isolat 5940 (17K zu R, 18A zu D, 28E zu N, 39Q zu H und 43D zu H). Im Vergleich der Epitopsequenz mit bereits veröffentlichten Sequenzen konnte gezeigt werden, daß diese Region in höchstem Maße konserviert ist. Daher erschienen die natürlich

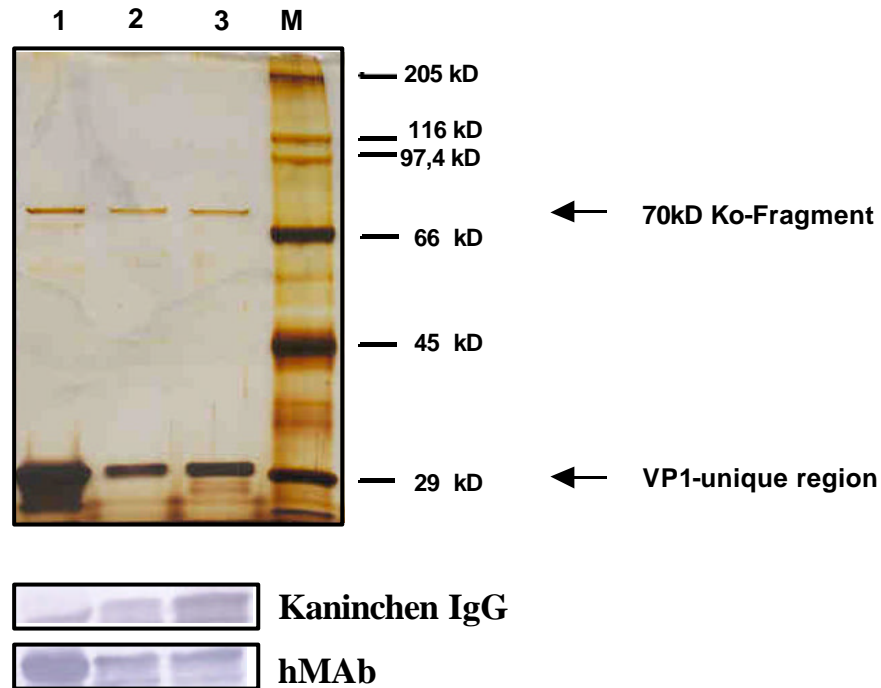


Abbildung C.6 Reinigung der Virusvarianten über Chitin-Affinitätschromatographie. Gezeigt ist ein silbergefärbtes Gel der gereinigten Proteine VP1N-pJB, VP1N-G und VP1N-5940 (Spuren 1, 2 und 3). Die Proteine laufen auf einer Höhe von ca. 30kD (Pfeil). Bei 70kD (Pfeil) befindet sich eine Bande, die mitgereinigt wurde. Western Blot Analyse mit Kaninchen IgG und humanen, monoklonalen IgGs (hMAbs), die gegen die VP1-unique region gerichtet sind, zeigen, daß alle Fragmente erkannt werden.

In einem weiteren Schritt sollten die spezifischen Antikörper-Antigen Interaktionen quantifiziert und auf Unterschiede in der Affinität untersucht werden, um Aussagen über die konformationelle Faltung und Stabilität des Epitops machen zu können. Dafür wurde ein QCM Biosensor eingesetzt, der auf dem Einsatz von piezoelektrischen Kristallen basiert (Sauerbrey, 1959).

Die Proben werden über ein Fließ-Injektionssystem eingespritzt und ihre Bindung am Monitor verfolgt. So kann die erhaltene Frequenz der Kristallschwingung direkt aufgenommen und am Bildschirm visualisiert werden. Frequenzunterschiede und Bindungskinetiken werden ohne den Einfluß von Viskositätseffekten erhalten. Die Bindungskinetiken ergeben Werte für die k_{off} - und k_{on} -Raten, aus denen sich die Dissoziationskonstante berechnen läßt (Abbildung C.7). $0,67\mu\text{M}$ des humanen monoklonalen Antikörpers wurden in das System eingespritzt und über Protein A an den Schwingquartz gekoppelt. Freie Stellen wurden über 0,025% BSA-Lösung abgesättigt. PBS als Kontrolle veränderte die Frequenz nicht mehr. Das Protein VP1N-pJB wurde in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ eingespritzt, der erhaltene

Frequenzunterschied der Kristallschwingung und der Bindung betrug -150Hz (Abbildung C.7.A). Die k_{on} - und k_{off} -Raten betrugen jeweils $8696\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und $0,00047\text{s}^{-1}$ (Abbildung C.7.B). Aus der Formel $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}} = 0,00047\text{s}^{-1}/8696\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} = 5,4 \times 10^{-8}\text{M}$ ergibt sich die Dissoziationskonstante für das Protein VP1N-pJB.

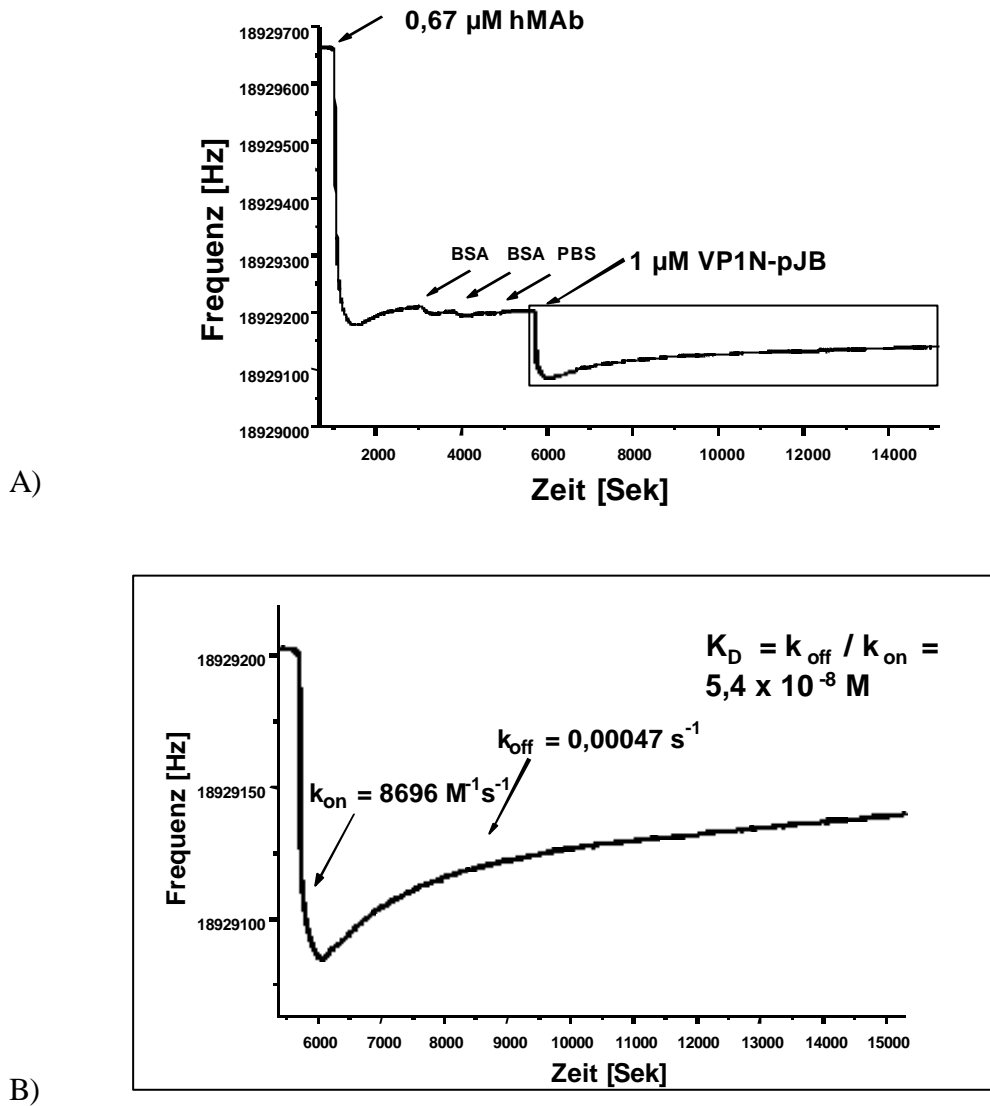


Abbildung C.7 Experimentelle Bedingungen für die Affinitätsmessungen mit dem Immunosensor.

A) Das Diagramm zeigt einen Zeitverlauf über das kinetische Experiment. Humane monoklonale Antikörper (hMAbs) ($0,67\mu\text{M}$) werden on-line in das Fließsystem eingespritzt und binden über Protein A an den Quarzkristall. Mit 0,025% BSA-Lösung werden zweimal unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. PBS gewährleistet, daß Puffereffekte keinen Einfluß nehmen können, da sowohl das Fließsystem als auch die Proben in PBS-Puffer vorliegen. **B)** Die Injektion von $1\mu\text{M}$ VP1N zeigt die aktuelle Kinetik. Die k_{on} - und k_{off} -Raten werden im Graphen gefittet, wie in der Abbildung gezeigt wird. Die Dissoziationskonstante ergibt sich aus der Formel $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}} = 0,00047\text{s}^{-1}/8696\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} = 5,4 \times 10^{-8}\text{M}$.

Die Proteine der Virusvarianten, VP1N-G und VP1N-5940, wurden in der gleichen Konzentration von 1 μ M eingespritzt (Abbildung C.8). Die Frequenzunterschiede zwischen VP1N-pJB und den Virusvarianten waren nur schwach (VP1N-G, -180Hz, VP1N-5940, -110Hz im Vergleich zu VP1N-pJB, -150Hz). Die davon abgeleiteten k_{on} -Raten (9587 und 7875M⁻¹s⁻¹) und k_{off} -Raten (0,00041 und 0,0004s⁻¹) sind in der gleichen Größenordnung wie die des VP1N-pJB (8696M⁻¹s⁻¹, 0,00047s⁻¹) Isolates. Die bestimmten Dissoziationskonstanten ergeben daher ähnliche Werte: 4,1x10⁻⁸M für VP1N-G; 5,2x10⁻⁸M für VP1N-5940 und 5,4x10⁻⁸M für VP1N-pJB. Jede Dissoziationskonstante wurde mindestens zweimal unabhängig voneinander bestimmt, dabei können die Frequenzunterschiede quartzabhängig schwanken. Dies wirkt sich nicht auf die k_{on} - und k_{off} -Raten und die daraus bestimmten K_D -Werte aus, die sich in der gleichen Größenordnung befinden.

Als Kontrollantigen dienten Parvovirus-ähnliche VP2-Partikel, denen die VP1-unique region völlig fehlt (Bärbel Kaufmann, Universität Potsdam). Sie wurden über rekombinante Baculoviren erzeugt und über Cäsiumchloridgradientultrazentrifugation gereinigt. Es konnte keinerlei Bindung der VP1-spezifischen Antikörper, die an der Kristalloberfläche immobilisiert waren, an die VP2-Partikel festgestellt werden. Die virus-ähnlichen VP2-Partikel binden jedoch an einen humanen, monoklonalen Antikörper, der gegen das VP2-Protein gerichtet ist und die partikuläre Form des Proteins erkennt (Gigler *et al.*, 1999).

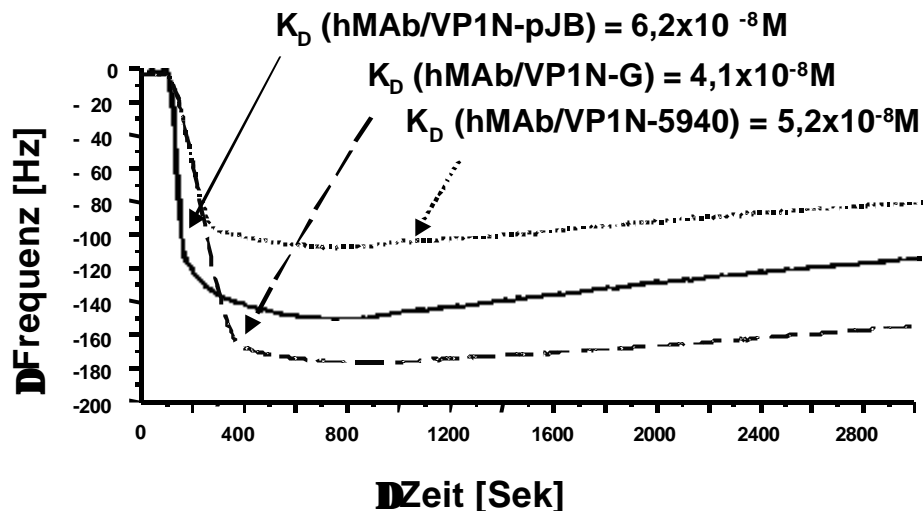


Abbildung C.8 Kinetik der Proteinvarianten VP1N-pJB, VP1N-G und VP1N-5940. Die Graphen der Kinetiken von VP1N-pJB, VP1N-G und VP1N-5940 werden in der Abbildung gezeigt. Die experimentellen Bedingungen werden in Abbildung C.7 beschrieben. Die Dissoziationskonstanten sind $5,4 \times 10^{-8} \text{M}$, $4,1 \times 10^{-8} \text{M}$ und $5,2 \times 10^{-8} \text{M}$.

Die Bindung eines Kaninchenserums (Gigler *et al.*, 1999), das gegen die VP1-unique region gerichtet ist, zeigte einen deutlich niedrigeren K_D -Wert von $1,7 \times 10^{-7} \text{M}$ im Vergleich zu dem, der bei Einsatz der humanen, monoklonalen Antikörper erhalten wurde und außerdem mußte eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Antigen (VP1N-pJB) eingespritzt werden, um einen Frequenzunterschied von -10Hz zu erhalten.

In weiteren Experimenten wurde die Fähigkeit der humanen, monoklonalen Antikörper untersucht, native Viruskapside aus Fruchtwasserproben (VP1-Protein maximal 5% und VP2-Protein mindestens 95%) und virus-ähnliche Mischkapside, bestehend aus maximal 30% VP1-Protein und mindestens 70% VP2-Protein, die rekombinant mittels Baculoviren erzeugt wurden, zu binden. Die erhaltenen Dissoziationskonstanten lagen bei $7,5 \times 10^{-8} \text{M}$ und $7,3 \times 10^{-8} \text{M}$ (nicht gezeigt). Somit sind diese Bindungen in der gleichen Größenordnung, wenn auch etwas schwächer als die der humanen, monoklonalen Antikörper zu dem Standardisolat VP1N-pJB ($5,4 \times 10^{-8} \text{M}$). Als Kontrolle für die nativen Kapside aus Fruchtwasserproben diente eine Probe, die über PCR als virus-negativ eingestuft worden war. Mit dieser Probe konnte keinerlei Bindung an die Antikörper am Kristall nachgewiesen werden. Zum Nachweis der rekombinanten VP1/VP2- und VP2-virus-ähnlichen Partikel wurden Elektronenmikroskopieaufnahmen in Zusammenarbeit mit Dr. Schröder, Institut für Pathologie, Universität Regensburg, gemacht (nicht gezeigt). Dabei konnten in beiden Proben Partikel

gefunden werden, die der Größe und dem Aussehen nach den nativen B19-Viruspartikeln ähnlich sind. Als Beweis für das Vorhandensein von VP1-Protein in den Partikeln wurden sie mit dem humanen, monoklonalen Antikörper, der gegen die unique region gerichtet ist, agglutiniert und abzentrifugiert. EM-Bilder zeigen die aggregierten Mischpartikel. Die Reinigung über Dichtegradientenzentrifugation ist ein weiterer Nachweis für die richtige Größe der Partikel und für das Vorhandensein des VP1-Proteins als Teil des Kapsids.

Die Biosensormessungen zeigten, daß die berechneten Dissoziationskonstanten ($4,1 \times 10^{-8} \text{ M}$ für VP1N-G; $5,2 \times 10^{-8} \text{ M}$ für VP1N-5940 und $5,4 \times 10^{-8} \text{ M}$ für VP1N-pJB, $7,5 \times 10^{-8} \text{ M}$ für VP1/VP2-virus-ähnliche Partikel und $7,3 \times 10^{-8} \text{ M}$ für native Viren) in der gleichen Größenordnung sind. Sie liegen der Größe nach in der für Antikörper-/Antigen-Bindungen gemessenen Bereich (Stryer, 1991). Offensichtlich beeinflussen die Aminosäurevariationen nicht die Interaktion des Antikörpers zu den Antigenvariationen. Dies deutet daraufhin, daß das Epitop leicht zugänglich ist, auf der Oberfläche der Proteindomäne und nicht in einer fest gefalteten globulären Struktur liegt. Die bisherigen Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß innerhalb des Aminoterminus (ungefähr Aminosäure 1-100) eine schleifenähnliche Struktur zu finden ist, die vielleicht durch Sekundärstrukturelemente stabilisiert wird. Diese Hypothese wird durch die Tatsache untermauert, daß sehr viele neutralisierende Epitope, die zu einem großen Teil linear sind, in dieser Region vorliegen (Aminosäuren 46-93). Die Affinität der humanen, monoklonalen Antikörper änderte sich auch bei der Bindung an VP1/VP2-virus-ähnliche Partikel bzw. an native Viruskapside nicht. Dies bestätigt die Vermutung, daß das Epitop nicht nur auf der Oberfläche der VP1-unique region liegt, sondern zusätzlich auf der Kapsidoberfläche leicht zugänglich ist. Die starke Reaktivität der VP1-spezifischen humanen, monoklonalen Antikörper macht sie zu optimalen Reagenzien für immuntherapeutische Ansätze bei der Behandlung von persistierenden Infektionen. Desweiteren sollte die Lage und Sequenz dieses neutralisierenden Epitops bei der Entwicklung eines Impfstoffes mitberücksichtigt werden. Bei caninen Parvoviren konnte kürzlich ein Peptidimpfstoff entwickelt werden, der auf einem einzigen immunogenen Peptid beruht und in der Lage ist, eine Virusinfektion zu verhindern (Gil *et al.*, 2001).

C4 Konformation und Faltung der VP1-unique region

Die Struktur der VP1-unique region ist ungeklärt, röntgenkristallographische Daten bei 80nm Auflösung deuteten auf eine eher ungefaltete Region hin (Agbandje *et al.*, 1994). Die bisher in dieser Arbeit beschriebenen Daten zeigen, daß sich das Epitop bei Aminosäuren 30-42 innerhalb einer konformationell gefalteten Umgebung befindet. Spektroskopische Methoden wie UV/VIS-, Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie dienen bei den nun folgenden Experimenten der Aufklärung von Sekundär- und Tertiärstrukturelementen innerhalb der Proteindomäne VP1-unique region.

Erste Ergebnisse wurden durch die Aufnahme von Differenzspektren der Proteindomänen VP1N-pJB und VP1N-5940 im Vergleich über UV/VIS-Spektroskopie erhalten. Da in der UV/VIS-Spektroskopie die aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr und Phe) am stärksten absorbieren, sind Messungen in dem Wellenlängenbereich um 280nm, bei dem aromatische Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum besitzen am aussagekräftigsten. Dabei ist die große Anzahl an Tryptophan- (drei) und Tyrosinresten (zehn) in der VP1-unique region von Vorteil. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 0,5mg/ml nativ und in 4M GdmCl denaturiert über einen Wellenlängenbereich von 260–340nm gemessen, das Spektrum des denaturierten Proteins vom Spektrum des nativen subtrahiert und das Differenzspektrum graphisch dargestellt (Abbildung C.9). Vor Subtraktion der jeweiligen Spektren wurden diese pufferkorrigiert, d.h. vom jeweiligen Proteinspektrum wurde das reine Pufferspektrum abgezogen. Beide Proteine zeigen charakteristische Maxima bei 285-288nm (Tyrosinmaximum) und 291-294nm (Tryptophanmaximum). Dies läßt vermuten, daß ein Teil der Tyrosin- und Tryptophanreste im Protein gefaltet vorliegt und erst nach Denaturierung mit 4M GdmCl dem Lösungsmittel zugänglich wird. Die Höhe der Maxima, ein Maß für den Unterschied zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand ist nur gering (maximal 0,06), sodaß von keiner sehr ausgeprägten Tertiärstruktur ausgegangen werden kann. Die beiden Proteine VP1N-pJB und VP1N-5940 im Vergleich zeigen ähnliche Maxima, sodaß man auch eine ähnliche Proteinfaltung vermuten kann. Im weiteren Verlauf der Experimente sollte die UV-Spektroskopie zur Proteinbestimmung mittels berechnetem Extinktionskoeffizienten eingesetzt werden. Da der Unterschied zwischen gefaltetem und ungefaltetem Protein sehr gering ist, wurde auf Denaturierung mittels GdmCl zur Konzentrationsbestimmung bei 280nm

verzichtet und diese mit gefaltetem Protein durchgeführt. Bei geringen Proteinausbeuten kann dadurch auf einen zusätzlichen Verdünnungsschritt verzichtet werden.

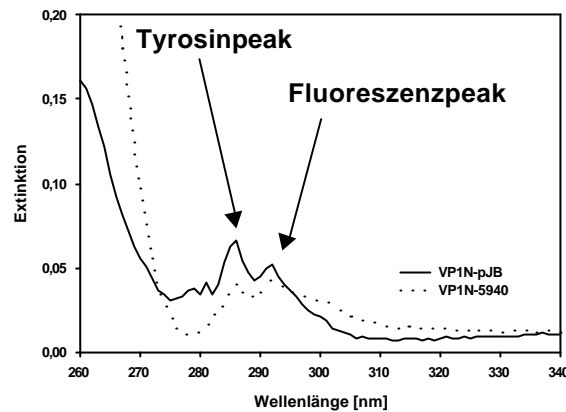
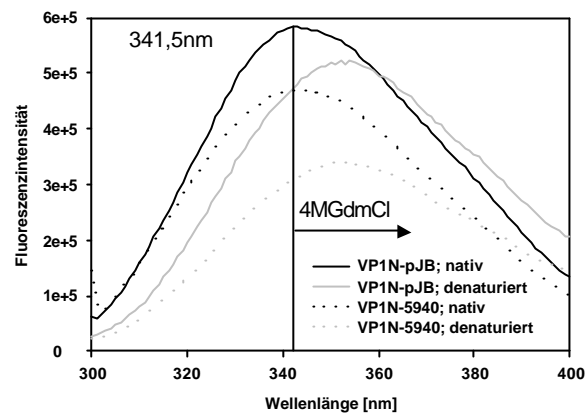


Abbildung C.9 Differenzspektren von nativem und denaturiertem VP1N-pJB und VP1N-5940. Die beiden Proteine (0,5mg/ml) wurden mit 4M GdmCl-Lösung denaturiert und das Spektrum des nativen Proteins von dem des denaturierten Proteins subtrahiert. Dabei ergeben sich diese für Differenzspektren charakteristischen Maxima: das Tyrosinmaximum zwischen 285-288nm und das Tryptophanmaximum zwischen 291 und 294 nm. Die Spektren wurden durch Abzug ihrer Pufferspektren korrigiert.

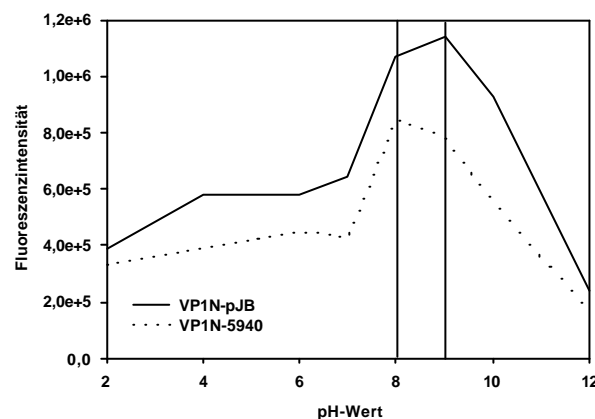
Weitere strukturelle Charakterisierungen fanden mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie statt. Die Proteine VP1N-pJB und VP1N-5940 emittieren maximales Licht bei einer Wellenlänge von 341,5nm. Gleiche Maxima der Proteindomänen deuten auf eine ähnliche Faltung hin. Denaturierung in 4MGdmCl führte zu verminderter Fluoreszenzemission und einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums um ca. 10nm in den längerwelligen Bereich (Abbildung C.10A). Es gelang mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie nicht, einen Übergang des Proteins vom nativem zum denaturierten Zustand zu messen, um Daten über eine eventuell vorhandene Tertiärstruktur des Proteins zu erhalten. Proteinübergänge deuten auf eine stabil gefaltete Tertiärstruktur mit einem energetischen Minimum hin. Bei Zugabe von geringsten Mengen an GdmCl entfaltete sich die Proteindomäne (nicht gezeigt). Zugabe von Harnstoff zeigte zwar ab einer Konzentration von 4M einen allmählichen Anstieg der Fluoreszenzintensität, jedoch kam es zu keinem charakteristischen Übergang. Diese Daten bestätigten die Ergebnisse aus der Differenzspektroskopie, bei der die Tertiärstruktur ebenfalls nur schwach ausgeprägt war.

Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der VP1-unique region ergaben, daß beide Proteine stärkste Fluoreszenzemission bei einem pH-Wert zwischen pH 8 und 9

besitzen, dies deutet auf ein pH-Optimum in diesem Bereich hin (Abbildung C.10B). Das bedeutet, daß das Protein in einem Puffer mit pH-Wert zwischen 8 und 9 eine gefaltete Konformation besitzt, sodaß sich seine aromatischen Aminosäuren vorwiegend in einer hydrophoben Umgebung abgeschlossen von den polaren Gruppen des Lösungsmittels befinden.



A)

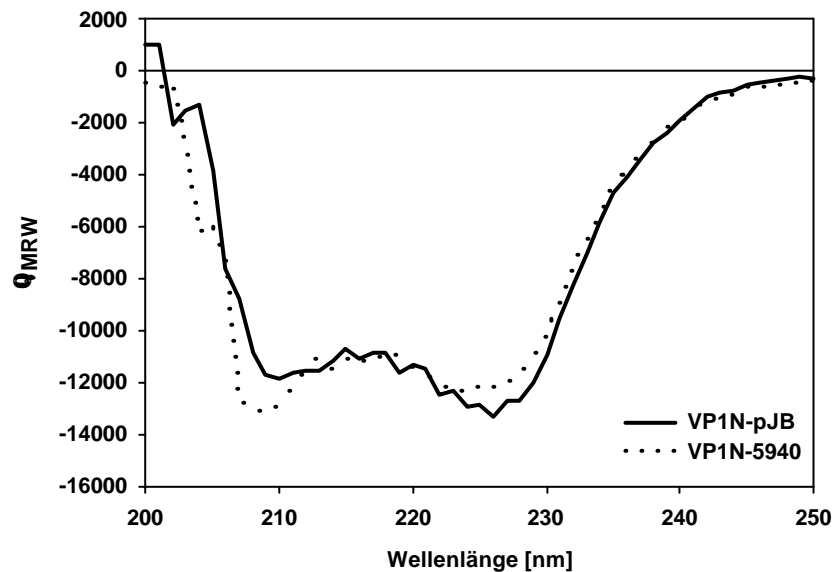


B)

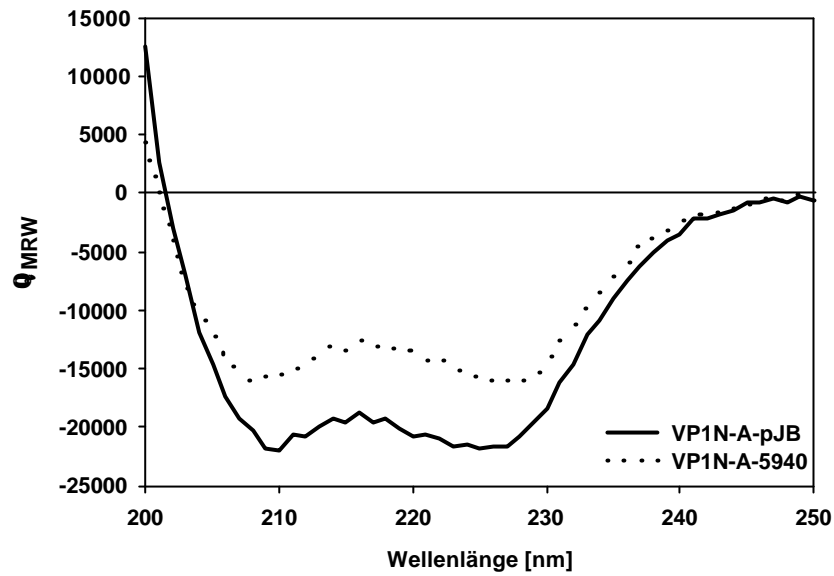
Abbildung C.10 Fluoreszenzspektren der Proteine VP1N-pJB und VP1N-5940: Denaturierung mit 4M GdmCl und pH-Abhängigkeit. A) Die nativen und denaturierten Spektren der VP1-unique region VP1N-pJB und VP1N-5940 fanden jeweils in einer Konzentration von 0,2µM statt. Beide Proteine besitzen ihr Fluoreszenzmaximum bei 341,5nm. Entfaltung führte zu einer schwächeren Fluoreszenzemission mit einer Verschiebung des Maximums zu 350nm. B) Die VP1-unique region wurde für 2 Stunden in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten inkubiert und dann bei einer Emissionswellenlänge von 340nm gemessen (Fluoreszenzmaximum). Beide Proteine besitzen ihr pH-Optimum zwischen 8 und 9. Die Spektren wurden durch Abzug ihrer Pufferspektren korrigiert.

Die CD-spektroskopische Charakterisierung im Fern-UV-Bereich (180-250nm) liefert Daten über Sekundärstruktur innerhalb eines Proteins. Anhand von Vergleichsspektren können Sekundärstrukturanteile berechnet werden. Auf Nah-UV-Spektren (250-320nm), die anhand von Vergleichsspektren Aussagen über eventuell vorhandene Tertiärstrukturelemente geben können, wurde in diesem Fall verzichtet, da die Struktur der VP1-unique region unbekannt ist.

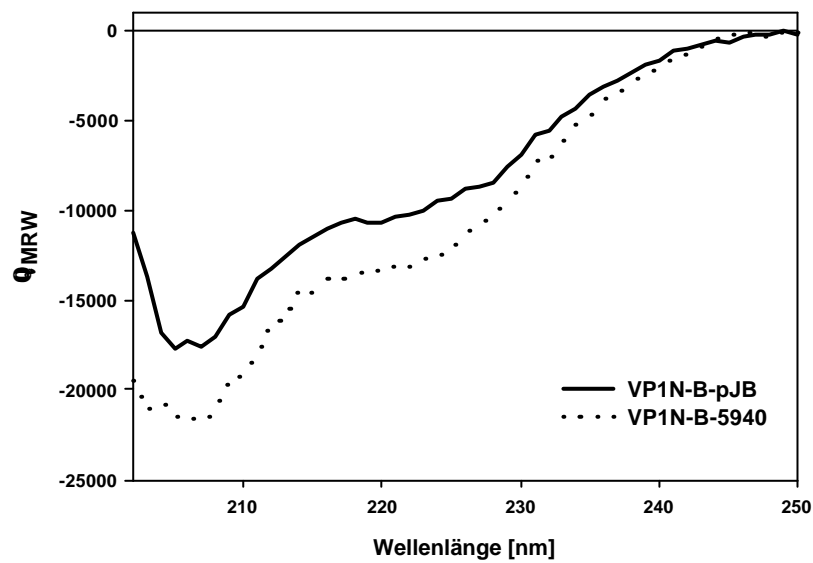
Unsere bisherigen Experimente lieferten bereits Hinweise auf eine strukturelle Faltung im aminoterminalen Teil der VP1-unique region. Aus diesem Grund wurden zur näheren Charakterisierung amino- und carboxyterminal verkürzte Fragmente (VP1N-A, 1-121, und VP1N-B, 91-227) (Standardisolat pJB und Variante 5940) in den bereits beschriebenen Vektor pET21a-int (siehe Abschnitt B2.1.3) kloniert, exprimiert und über das Impact T7 Expressionssystem über Chitin-Affinitätschromatographie gereinigt. Sowohl von der kompletten VP1-unique region, als auch von den amino- und carboxyterminal verkürzten Fragmenten (Standardtyp und Variante 5940) wurde ein CD-Spektrum gemacht (Abbildung C.11A, B und C).



A)



B)



C)

Abbildung C.11 CD-Spektren der VP1-unique region, der amino- und carboxyterminal verkürzten Fragmente VP1N-A und VP1N-B, jeweils Standardisolat pJB und Variante 5940. Die Proteine VP1N-pJB und VP1N-5940 besitzen ähnliche CD-Spektren mit charakteristischen Minima bei 207 und 225nm (A). Die verkürzten Fragmente VP1N-A-pJB und VP1N-A-5940 besitzen gleiche Maxima bei 207 und 225nm, wobei jedoch die Intensitäten variieren (B) ebenso bei den Fragmenten VP1N-B-pJB und VP1N-B-5940 (C).

Die CD-Spektren der Proteine VP1N-pJB und VP1N-5940 bestätigten vorhergehende Ergebnisse und lieferten darüberhinaus Hinweise, daß die beiden Proteine identisch gefaltet sind (Abbildung C.11A). Die CD-Spektren besitzen charakteristische Minima bei 207 und 225nm. Desweiteren ergaben Berechnungen über das Programm CNN von Dr. Gerald Böhm, Universität Halle/ Wittenberg erste Angaben über vorhandene Sekundärstrukturanteile in der VP1-unique region: 43,2% α -Helix, 12,5% β -Faltblatt, 15,6% β -Turn und 22,8% Random Coil (Tabelle C.2). Die Fragmente VP1N-A-pJB und VP1N-A-5940 besitzen ähnliche CD-Spektren, ebenso die Fragmente VP1N-B-pJB und VP1N-B-5940. Dies bestätigt noch einmal die Vermutung, daß die VP1-unique region identisch gefaltet ist. Darüberhinaus kann man folgern, daß weder der aminoterminal Abschnitt, noch der carboxyterminale Abschnitte allein für die charakteristische Faltung der VP1-unique region verantwortlich ist, stattdessen bildet sich die Gesamtkonformation aus einer Überlagerung der Strukturen beider Proteine. Sekundärstrukturberechnungen für den aminoterminalen Teil VP1N-A ergeben Werte von 40,5% α -Helix, 13,5% β -Faltblatt, 15,8% β -Turn und 25,7% Random Coil. Für den carboxyterminalen Teil ergeben sich Werte von 29,2% α -Helix, 27,1% β -Faltblatt, 18,7% β -Turn und 27,6% Random Coil. Da es sich um überlappende Proteinfragmente handelt, lassen sich die beiden Spektren nur bedingt überlagern und als Gesamtspektrum betrachten (Tabelle C.2).

	VP1N [%]	VP1N-A [%]	VP1N-B [%]
α -Helix	43,2	40,5	29,2
β -Faltblatt	12,5	13,5	27,1
β -Turn	15,6	15,8	18,7
Random Coil	22,8	25,7	27,6

Tabelle C.2 Übersicht über die Sekundärstrukturanteile innerhalb der VP1-unique region und amino- oder carboxyterminal verkürzter Fragmente VP1N-A oder VP1N-B. Die angegebenen Werte stammen aus Sekundärstrukturvergleichen mithilfe des Programms CNN von Dr. Gerald Böhm, Universität Halle/ Wittenberg. Die Prozente beziehen sich auf den Anteil an Sekundärstruktur im jeweiligen Protein.

CD-Messungen bei pH-Werten zwischen 7,5 und 9 besaßen keinerlei Auswirkungen auf die Sekundärstruktur der gesamten VP1-unique region (nicht gezeigt) und bestätigten

somit die Ergebnisse aus der Fluorimetrie, bei der das pH-Optimum der VP1-unique region zwischen 8 und 9 lag. Darauf läßt sich folgern, daß bei einem pH-Wert zwischen 8 und 9 die hydrophoben Reste in der Proteindomäne gepackt vorliegen und von polaren Gruppen des Lösungsmittels unbeeinflusst sind, ebenso wie die α - und β -helikalen Elemente ihre Form nicht verändern. Hingegen wich das CD-Spektrum der VP1-unique region bei einem pH-Wert von 5,5 deutlich von den vorhergehenden Spektren ab, die Intensität der CD-Minima sank auf etwa ein Drittel herab. Dies deutet daraufhin, daß ein saurer pH-Wert zu einer starken Sekundärstrukturverminderung innerhalb dieser Proteindomäne führt. Die Sekundärstrukturanteile müssen somit auf der Oberfläche der VP1-unique region liegen, um vom pH-Wert des Lösungsmittels abhängig zu sein.

Messung eines Hitzeüberganges durch allmähliches Erwärmen der VP1-unique region von 20 auf 95°C ergab, daß das Protein sofort beginnt, sich langsam zu entfalten. Nach 50°C steigt diese Entfaltung stark an, flacht jedoch auch nach 95°C nicht ab. Einen charakteristischen Übergang, der wie eine sigmoidale Kurve aussieht, konnte man nicht sehen (Schmid, 1997). Es ist nicht klar, ob das Fehlen eines Überganges und die langsamen Entfaltungsreaktionen Hinweise auf eine enorme Stabilität der VP1-unique region sind oder eher ein Anzeichen für das Fehlen einer globulär gepackten Tertiärstruktur. Vielleicht sollten aber auch beide Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Zukünftige Röntgenkristallographieexperimente sollen über die Tertiärstruktur der VP1-unique region Auskunft geben.

Zusammenfassend läßt sich zur spektroskopischen Charakterisierung folgendes sagen: Das Protein besitzt gemäß den CD-Spektren klar definierbare Sekundärstrukturelemente. Diese finden sich auch in amino- bzw. carboxyterminal verkürzten Proteinfragmenten der VP1-unique region (VP1N-A und VP1N-B). Die konformationelle Faltung von Standardisolat pJB und Variante 5940 sind sowohl in der gesamten VP1-unique region, als auch den verkürzten Fragmenten sehr ähnlich, dies läßt auf eine identische Faltung des Proteins schließen. Die CD-Spektren zeigen, daß die VP1-unique region relativ stabil gegenüber Hitze ist. Erhitzen auf 95°C führt zwar zu einer allmählichen Entfaltung des Proteins, man kann aber keinen charakteristischen Übergang messen. Andererseits sind die Sekundärstrukturelemente der VP1-unique region in besonderem Maße von pH-Änderungen abhängig, wie die CD- und Fluoreszenzspektren zeigen, und diese äußern sich besonders stark, wenn man den pH-Wert in den sauren Bereich verschiebt. Das pH-Optimum zwischen 8 und 9 korreliert

mit dem pH-Optimum von sekretorischen Phospholipasen, die zwischen 8 und 9 ihre stärkste Aktivität besitzen. Es stellt sich die Frage, ob pH-abhängige Strukturumlagerungen an der Regulation der Enzymaktivität beteiligt sind. Gemäß den Fluoreszenzspektren ist die Tertiärstruktur der VP1-unique region sehr dynamisch. Es ist zwar nach Denaturierung mit 4M GdmCl ein Unterschied in der Intensität und Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums zu beobachten, dieses kann jedoch nicht als Übergang visualisiert werden. Die Frage besteht, ob man bei der VP1-unique region von einer ungefalteten Struktur ausgehen kann, oder ob nicht gerade die dynamische Struktur mit ihren offensichtlich vorliegenden Sekundärstrukturelementen für die Funktion, die im folgenden Kapitel näher untersucht wird, von entscheidender Bedeutung ist. Um die Strukturaufklärung zu vervollständigen bleibt die Frage nach der eventuellen Quartärstruktur, einer Zusammenlagerung von VP1-Fragmenten nicht aus. Es konnte über Gelfiltrationsanalyse gezeigt werden, daß die VP1-unique region in Konzentrationen bis zu 0,5mg/ml als Monomer vorliegt. Diese Ergebnisse wurden über native Page bestätigt, in der die VP1-unique region als einzelne Bande gezeigt werden konnte. Di- oder Trimerisierung des Proteins kann im Fall der VP1-unique region durch die Lage im Kapsid reguliert werden und könnte im *in-vitro* System auch bei hohen Proteinkonzentrationen nicht nachzuweisen sein. Bisher weiß man nicht, ob die VP1-unique region im nativen Viruskapsid an einer Stelle liegt, oder über das Kapsid verteilt ist. Alle Strukturexperimente wurden mit der Proteindomäne VP1-unique region bzw. mit verkürzten Fragmenten durchgeführt. So stellt sich automatisch die Frage nach dem Einfluß des VP2-Proteins. Die Vermutung besteht, daß die VP1-unique region im VP1-Protein durch Aggregation des VP2-Proteins zusammengelagert wird. Gerade sekretorische Phospholipasen A2 üben ihre Funktion oft als Di- oder Trimere aus (Kramer *et al.*, 1989). Zukünftige IEM-Experimente (Immunogold-Elektronenmikroskopie) sollen über diese Fragestellung Auskunft geben.

C5 Funktion der VP1-unique region als Phospholipase A2

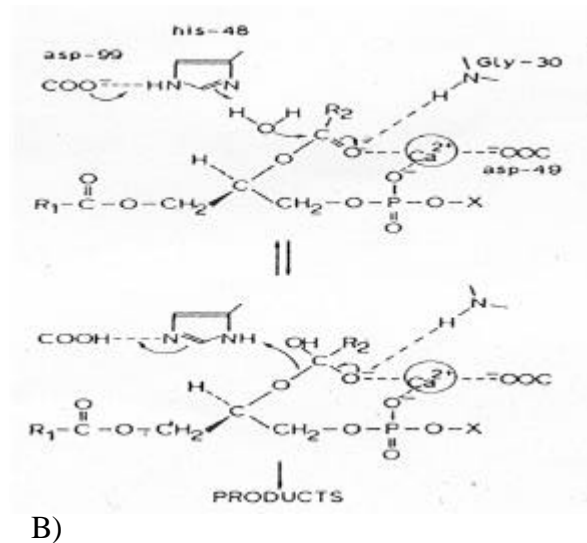
Phospholipasen A2 katalysieren stereospezifisch die Esterhydrolyse an der sn2-Position eines Phosphoglycerids in ein Lysophospholipid und eine Fettsäure (Abbildung C.12). Die Reaktion erfolgt dabei ähnlich wie bei den Serinproteasen über eine katalytische Triade (His, Asp und Wasser), bei dem das Wassermolekül durch Austausch von Protonen zu einem reaktiven Nukleophil wird, das die Esterhydrolyse einleitet. Die

eigentliche Reaktion erfolgt über einen vierbindigen Übergangszustand, der durch ein Ca^{2+} -Ion stabilisiert wird.

Phospholipid + H_2O

– PLA_2

Lysophospholipid + Fettsäure



A)

B)

Abbildung C.12 Reaktion der Phospholipase A2. Die Phospholipase A2 hydrolysiert ein Phospholipid stereospezifisch an der sn2-Position in ein Lysophospholipid und eine Fettsäure (A). Die Reaktion wird durch eine katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren His48, Asp99 und einem Wassermolekül initiiert, die aus dem Wassermolekül ein reaktive Nukleophil macht. Die eigentliche Reaktion, die Esterhydrolyse, erfolgt über einen vierbindigen Übergangszustand, bei dem aus Phospholipiden und Wasser Lysophospholipide und Fettsäuren entstehen. Stabilisiert wird die Reaktion durch ein Ca^{2+} -Ion.

An der sn2-Position werden vorwiegend Arachidonsäuren freigesetzt, aus denen durch weitere Enzymreaktionen Eikosanoidhormone (Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane) gebildet werden, die bei Entzündungen vorkommen. Erhöhte Phospholipase A2 Aktivitäten können demnach aufgrund eines Anstiegs an Inflammediatoren zu Entzündungsreaktionen führen bzw. zum Auftreten von Antiphospholipidantikörpern, die für verschiedene Krankheitsmanifestationen verantwortlich sind.

C5.1 Untersuchungen zur Enzymaktivität in vitro

Aufgrund von Sequenzhomologien wurde im carboxyterminalen Teil der VP1-unique region zwischen Aminosäure 130 und 195 das Motiv für das aktive Zentrum einer sekretorischen Phospholipase A2 vermutet (Peter Tijssen, 1st Parvovirus Euroconference Health Benefits and Risks from Parvovirus Infections, Granada, Spanien, 1999). Abbildung C.13 zeigt die Lage der Phospholipase A2 im gesamten VP1-Protein und der VP1-unique region. Aufgrund der Ähnlichkeit kann man

schließen, daß die Aminosäuren 153 (His), 157 (Tyr), 168 (Tyr) und 195 (Asp) das katalytische Netzwerk für die Enzymaktivität bilden (Kramer *et al.*, 1989). Die Aminosäuren 130 (Tyr), 132 (Gly), 134 (Gly) und 154 (Asp) sind vermutlich für die Ca^{2+} -Ionen-Bindung verantwortlich und die Aminosäure 162 (Lys) für die Bindung an Phospholipidoberflächen wie z.B. zelluläre Membranen oder Membrankompartimente. Dieser Bereich ab Aminosäure 130-195 konnte aus Sequenzvergleichen unserer bereits veröffentlichten B19-Genomsequenzen (Abschnitt C3.1) als stark konserviert eingestuft werden. In der Abbildung C.13 wird auch die Lage der an den Globosidrezeptor-bindenden Region ab Aminosäure 577 bis 677 im VP1-Protein gezeigt. Diese Region wurde anhand von Experimenten mit neutralisierenden Antikörpern festgelegt (Chipman *et al.*, 1996). Die direkte Bindung der Region an Globosid konnte noch nicht gezeigt werden.

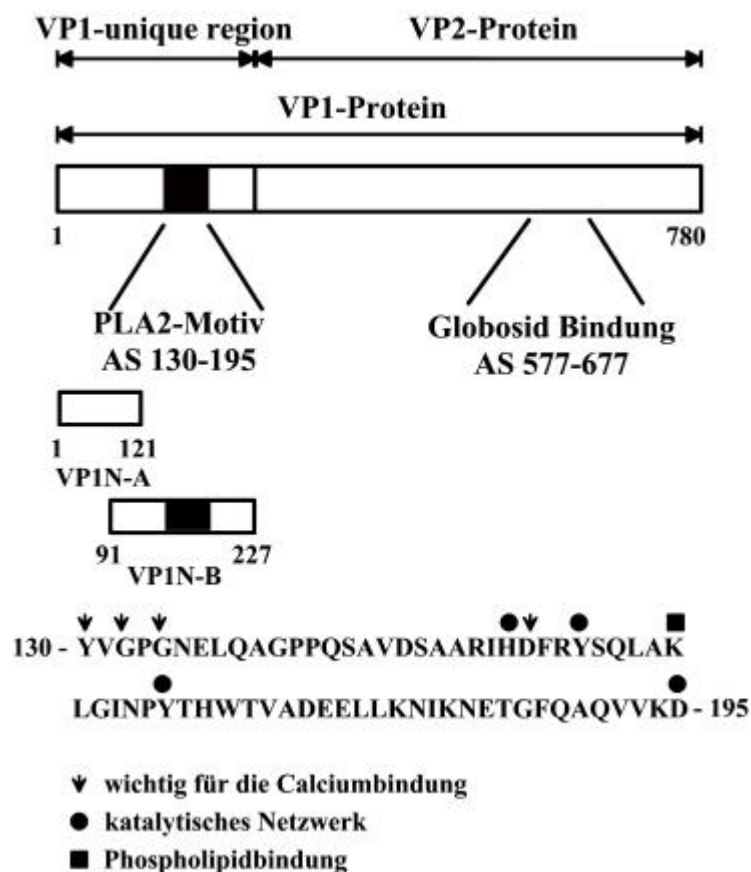


Abbildung C.13 Lage der für die Phospholipase A2 wichtigen katalytischen Reste. Gezeigt ist die VP1-unique region zusammen mit dem VP2-Protein. Das katalytische Motiv für die Phospholipase A2 ist in der kompletten VP1-unique region und im carboxyterminalen Fragment zu finden. Mit Pfeil sind die für die Calciumbindung wichtigen Aminosäurereste markiert, mit Kreis die Reste, die das katalytische Netzwerk bilden und mit Viereck, die hydrophobe Bindungsstelle.

Desweiteren ergaben Sequenzvergleiche mit bereits charakterisierten extrazellulären, nicht-pankreatischen Phospholipasen A2, daß der Bereich ab Aminosäure 100 für die Aktivität der VP1-unique region ausreichend sein sollte, da er alle für die Katalyse entscheidenden Aminosäurereste enthält (Kramer *et al.*, 1989). Daher wurden amino- und carboxyterminal verkürzte Fragmente VP1N-A und VP1N-B in den bereits beschriebenen Vektor pET21a-int kloniert, exprimiert und über Chitin-Affinitätschromatographie über das Impact T7 Expressionssystem gereinigt (Abbildung C.13). Die spektroskopische Charakterisierung dieser Fragmente ist unter Kapitel C.4 beschrieben.

Um die Phospholipase A2-Aktivität in der VP1-unique region experimentell nachweisen zu können, wurde eine Methode in Zusammenarbeit mit Dr. Gerhard Liebisch und Prof. Schmitz (Institut für klinische Chemie, Universität Regensburg) entwickelt. Das synthetisierte und gereinigte Protein wurde dabei zusammen mit Phospholipid-Liposomen aus β -Arachidonyl- γ -Stearoyl-Phosphatidylcholin (PC) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Während der Reaktion hydrolysiert die Phospholipase A2 die Phospholipide an der sn2-Position in Fettsäuren und Lysophospholipide (Abbildung C.12). Gestoppt wurde diese Reaktion durch eine Lipidextraktion, die im Anschluß durchgeführt wurde. Die extrahierten Lipide bzw. Lipidabbauprodukte wurden über *Electrospray Ionization* Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) analysiert. Zur Standardisierung der Methode und zum Vergleich wurde neben der VP1-unique region die Phospholipase A2 aus Bienengift zur Kontrolle in An- und Abwesenheit von Ca^{2+} -Ionen den Reaktionsansätzen zugegeben (siehe Abbildung C.14).

Die Produktanalyse lieferte ausschließlich γ -Stearoyl-Lysophosphatidylcholin (LPC) als Spaltprodukt sowohl für die VP1-unique region als auch die Bienengift Phospholipase A2. Das Intensitätsverhältnis der hydrolysierten Produkte (LPC zu PC) wurde eingesetzt, um das Ausmaß der Phospholipase A2-Aktivität zu quantifizieren. Als VP1-unique region wurden die gereinigten Proteindomänen des Standardisolates VP1N-pJB und der Variante VP1N-5940 eingesetzt. Die Aktivitätswerte beider Enzyme war identisch (nicht gezeigt). Dies deckt sich mit den spektroskopischen Ergebnissen, die zeigen, daß beide Proteine identische Faltung besitzen. Desweiteren werden die Ergebnisse von VP1N-pJB und VP1N-5940 unter dem Begriff B19-VP1N zusammengefaßt.

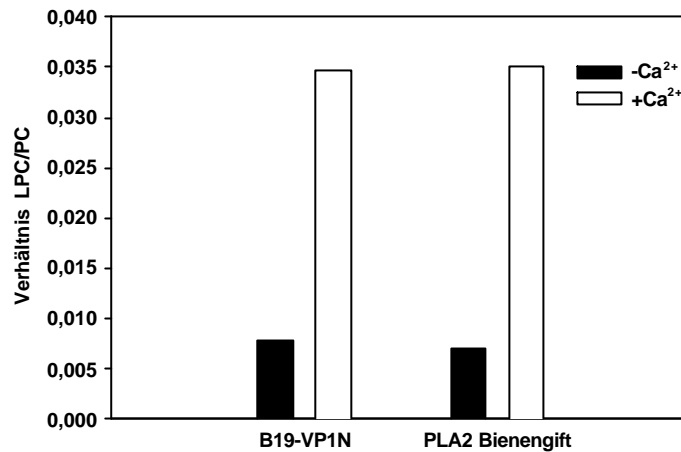


Abbildung C.14 Phospholipase A2 Assay. Die VP1-unique region (1 μ M) und die Phospholipase A2 aus Bienengift (0,017 μ M) zur Kontrolle wurde mit Phospholipid-Liposomen mit und ohne 10mM Ca²⁺-Ionen für 10 Minuten bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von Lösungsmitteln für die Lipidextraktion gestoppt. Die extrahierten Lipide wurde im ESI untersucht. Das Verhältnis von LPC/PC (γ -Stearoyl-Lysophosphatidylcholin/ β -Arachidonyl- γ -Stearoyl-Phosphatidylcholin) wurde bestimmt. Die Reaktion wurde mit der VP1-unique region aus dem Standardisolat pJB und der Variante 5940 durchgeführt. Da die Aktivitäten gleich waren, wurde nur ein Wert für die VP1-unique region (B19-VP1N) angegeben.

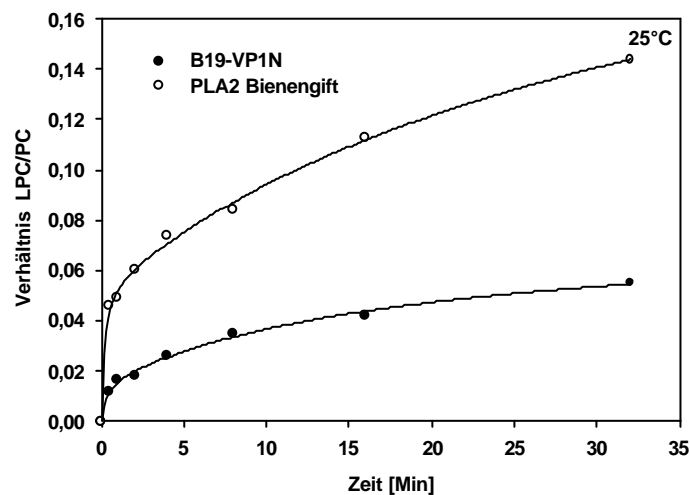


Abbildung C.15 Enzymkinetik der VP1-unique region (B19-VP1N) und der Phospholipase A2 aus Bienengift (PLA2 Bienengift). Die VP1-unique region (2 μ M) und die Bienengift Phospholipase A2 (0,034 μ M) wurden für 32 Minuten bei 25°C in der Gegenwart von 10mM Ca²⁺-Ionen mit den Liposomen inkubiert. Die Reaktion wurde nach 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 und 32 Minuten gestoppt und das LPC/PC-Verhältnis gebildet.

Die Aktivität der VP1-unique region (B19-VP1N) und der Bienengift Phospholipase A2 (PLA2 Bienengift) ist abhängig von der Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen (10mM), gezeigt durch einen Anstieg des LPC/PC-Verhältnisses von 0,008 auf 0,035 (Abbildung C.14). Um jedoch vergleichbare Aktivitäten beider Enzyme zu erhalten, mußte von der VP1-unique region eine höhere Konzentration (1 μ M) im Vergleich zur Bienengift Phospholipase A2 (0,017 μ M) eingesetzt werden. Die Reaktion hörte auf, als 10% des Substrates hydrolysiert waren (10 Minuten bei 37°C). Die Messung einer Enzymkinetik bei 25°C zeigte, daß die Aktivität der Bienengift Phospholipase A2 im Vergleich zur VP1-unique region um das Doppelte erhöht ist (Abbildung C.15).

Die Phospholipase A2-Aktivität in der VP1-unique region wurde zeitabhängig von den zwei spezifischen irreversiblen Inhibitoren Manoalid (MLD) und 4-Bromphenacylbromid (BPB) gehemmt (Abbildung C.16). Manoalid, ein marines Sesterterpen aus *Luffariella variabilis*, bindet kovalent an Lysinreste und 4-Bromphenacylbromid an Histidinreste, die Teile des aktiven Zentrums und der hydrophoben Bindestelle im Enzym sind (Nuhn und Koch, 1993). 100 μ M Manoalid und 1mM Bromphenacylbromid reichten aus, um die VP1-unique region zeitabhängig zu inhibieren. Geringere Konzentrationen zeigten kaum Effekt. Zu Beginn der Reaktion kommt es nach Inkubation der VP1-unique region mit 4-Bromphenacylbromid zu einem Anstieg der Aktivität. Dies ist vermutlich auf Stabilisierungseffekte im Protein zurückzuführen. Beide Inhibitoren binden irreversibel, die Reaktion ist nicht umkehrbar.

Um die Phospholipase A2 Aktivität der VP1-unique region weiter zu charakterisieren, wurden die synthetisierten und gereinigten Subfragmente VP1N-A (Aminosäuren 1-121) und VP1N-B (Aminosäuren 91-227) in der Reaktion eingesetzt (Abbildung C.17). Das aminoterminalen Fragment (VP1N-A) zeigte keinerlei Aktivität. Das carboxyterminale Fragment (VP1N-B) zeigte eine Aktivität, die geringer als die der kompletten VP1-unique region ist. Das bedeutet, daß das VP1N-B Fragment alle für die Katalyse wichtigen Aminosäuren enthält. Um jedoch maximale Aktivität zu entfalten, ist das aminoterminalen Fragment nötig, um das Enzym zu stabilisieren bzw. die Zugänglichkeit des Substrates zum aktiven Zentrum zu kontrollieren. Das verkürzte Fragment VP1N-B zeigte ähnliche Ca^{2+} -Ionen-Abhängigkeit wie die komplette VP1-unique region.

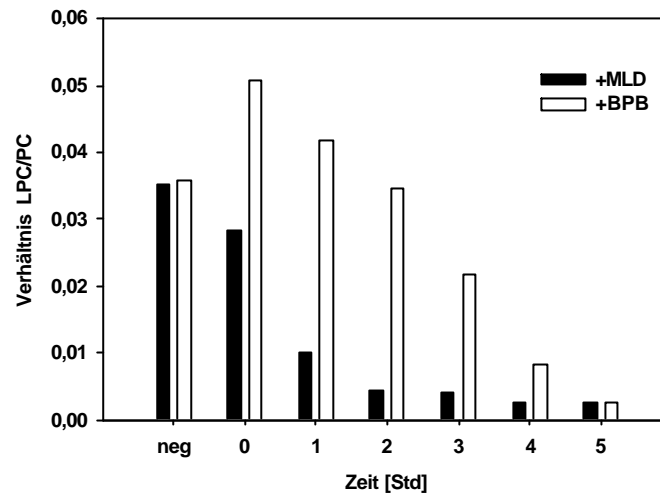


Abbildung C.16 Inhibition der Phospholipase A2-Aktivität mit Manoalid (MLD) und 4-Bromphenacylbromid (BPB). Die VP1-unique region (1 μ M) wurde mit 100 μ M MLD und 1mM BPB für 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden vorinkubiert. Die Negativprobe wurde 5 Stunden ohne Inhibitor inkubiert. Nach Durchführung des Phospholipase A2 Assays wurde das LPC/PC-Verhältnis bestimmt.

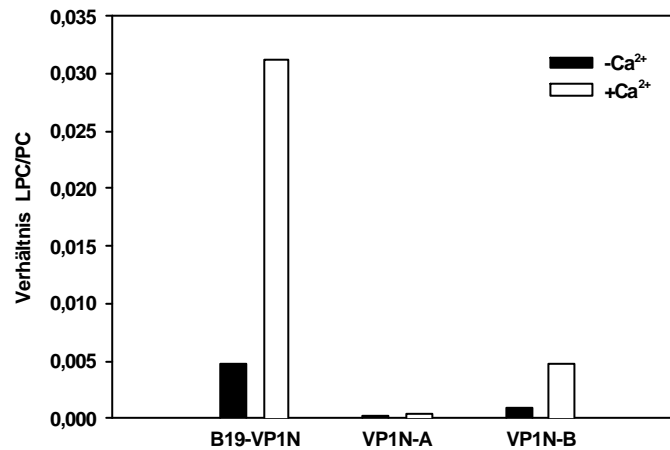


Abbildung C.17 Vergleich der VP1-unique region (B19-VP1N) mit verkürzten Subfragmenten der Proteindomäne VP1N-A und VP1N-B. Die Aktivität der Vollängen-VP1-unique region (1 μ M) wird mit denen der Subfragmente VP1N-A und VP1N-B (1 μ M) mit und ohne 10mM Ca²⁺-Ionen verglichen.

In weiteren Experimenten wurden virus-ähnliche Partikel, bestehend aus VP1/VP2-Proteinen und VP2-Proteinen ohne VP1-Protein auf ihre Phospholipase A2-Aktivität untersucht (Abbildung C.18). Die VP2-Kapside zeigten keinerlei Aktivität. Das LPC/PC-Verhältnis der VP1/VP2-Kapside lag bei 0,0035 und damit 10mal niedriger als das der VP1-unique region (0,035). Dies läßt sich dadurch erklären, daß das VP1-Protein in den virus-ähnlichen Mischpartikeln in einem Verhältnis von bis zu 30 zu 70 vorliegt, somit nur max. 0,3µM VP1-Protein eingesetzt werden konnte. Deshalb entspricht die gemessene Aktivität einem Drittel der Aktivität der VP1-unique region. Zusätzlich liegt die VP1-unique region auf den viralen Partikeln verteilt vor und nicht jede Domäne ist den Liposomen zugänglich. Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß die Aktivität der VP1-unique region im Vergleich zu den Mischpartikeln um das Zehnfache niedriger ist.

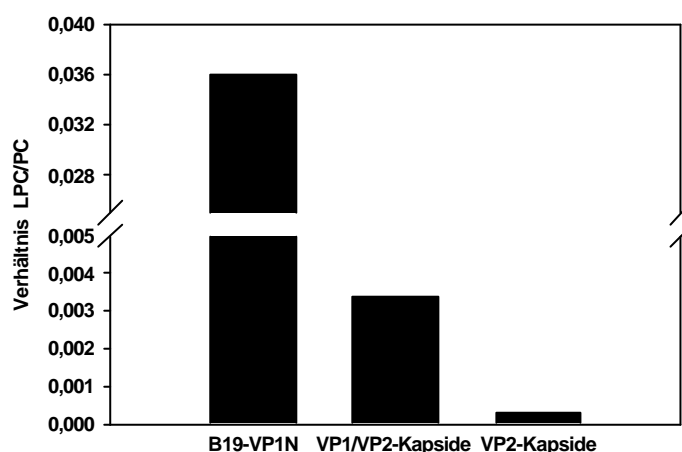


Abbildung C.18 Vergleich der VP1-unique region (B19-VP1N) mit virus-ähnlichen Partikeln. Die Phospholipase A2 Aktivität der VP1-unique region (1µM) wurde mit der von virus-ähnlichen Partikeln aus VP1/VP2-Protein (VP1/VP2-Kapside) (Proteinkonzentration: 1µM) und VP2-Protein (VP2-Kapside) (Proteinkonzentration: 1µM) verglichen.

Offensichtlich befindet sich die enzymatische Aktivität auf der Oberfläche der VP1/VP2-virus-ähnlichen Partikel. Der Mechanismus, wie die VP1-unique region zu den Liposomen gelangt, seine Substrathydrolyse beginnt und wie die Reaktivität kontrolliert wird, ist jedoch noch immer unklar und bleibt für zukünftige Untersuchungen ein interessantes Forschungsobjekt.

In diesem Zusammenhang untersuchten wir, ob der Globosidrezeptor als Substrat für die in der VP1-unique region vorhandene Phospholipase A2 fungieren könnte. Rezeptorspaltende Aktivität findet z.B. bei Influenzaviren statt, die nach erfolgter Infektion ihren N-Acetyl-Neuraminsäure-Rezeptor spalten, damit ihre Nachkommenviren von der Wirtszelle freigesetzt werden (Modrow/Falke, 1997). Weitere rezeptorspaltende Eigenschaften konnten bei Vertretern der Paramyxoviren und dem P22-Phagen, einem Salmonellenphagen gezeigt werden.

Analog dazu wurde die VP1-unique region nach rezeptorspaltender Aktivität getestet. Dazu wurden Mischliposomen aus β -Arachidonyl- γ -Stearoyl-Phosphatidylcholin und Globosid in einem Verhältnis von 1:10 hergestellt und mit der VP1-unique region bzw. den virusähnlichen Mischpartikeln inkubiert. Diese Vorgehensweise beeinträchtigte in keiner Weise die Phospholipase A2-Aktivität. Desweiteren ergab die massenspektrometrische Produktanalyse keinerlei Produkte, die auf eine Globosidhydrolyse hindeuten würden (nicht gezeigt). Daher ist die Phospholipase A2 in der VP1-unique region nicht mit einer potentiellen rezeptorzerstörenden Aktivität assoziiert. Ihre Funktion im viralen Lebenszyklus bleibt weiter ungeklärt. Die Phospholipase A2 Aktivität in Parvovirus B19 könnte für das Eintreten des Virus in die Zielzelle durch die Bindung an einen Ko-Rezeptor notwendig sein. Diese Hypothese wird durch die Tatsache untermauert, daß Globosid allein nicht für den starken Zelltropismus von B19 verantwortlich sein kann, da das Glycosphingolipid nicht nur auf erythroiden Vorläuferzellen sitzt, sondern auch auf Megakaryozyten und Endothelzellen, die nicht permissiv für eine erfolgreiche B19-Infektion sind (Brown *et al.*, 1993). Zur Bestätigung dieser Hypothese konnte unsere Arbeitsgruppe über Immunfluoreszenz zeigen (Diplomarbeit Kerstin Zarniko), daß fluoreszenzmarkierte VP1-unique region an permissive MB-02 Zellen, die mit Erythropoietin stimuliert wurden, binden kann, nicht jedoch an unstimulierte MB-02-Zellen bzw. an HELA-S3 und K562-Zellen als Negativkontrolle (nicht gezeigt). Es konnte nicht festgestellt werden, ob die Bindung an der Zelloberfläche oder intrazellulär stattfindet. Eine unspezifische Bindung der VP1-unique region an Phospholipide kann ausgeschlossen werden, da keinerlei Bindung an den Negativkontrollen zu sehen war. Dies verstärkt die Vermutung, daß die VP1-unique region eine wichtige Rolle bei der zellspezifischen Adsorption und Penetration in die Zielzellen haben könnte. Als möglicher Kandidat wird ein Phospholipase A2-Rezeptor vermutet. Erst kürzlich konnten Rezeptoren im Gehirn und in Muskelzellen identifiziert und charakterisiert werden, an die

sekretorische Phospholipasen A2 binden können (Lambeau und Lazdunski, 1999). Es ist anzunehmen, daß ähnliche Rezeptoren auch in anderen Geweben vorkommen und entwicklungsabhängig reguliert werden. Die Funktion der Phospholipase A2 in Parvovirus B19 ist damit immer noch ungeklärt. Sie könnte für die Virusfreisetzung aus den infizierten Zellen notwendig sein, indem sie sich des sekretorischen Weges für die Freisetzung von Phospholipasen A2 bedient. Es konnte gezeigt werden, daß Phospholipasen A2 nach Stimulation durch IL6 und TNF α sezerniert werden (Mukherjee *et al.*, 1994). Nach Freisetzung gelangen die Enzyme zu ihren Zielzellen durch Bindung an einen spezifischen Phospholipase-A2 Rezeptor, werden endozytotisch aufgenommen und zum Nukleus transportiert (Lambeau und Lazdunski, 1999). Das Parvovirus B19 könnte diesen Phospholipase A2-Weg für seine eigenen Zwecke nutzen, indem es durch Interaktion der VP1-unique region mit Phospholipase A2-Rezeptoren in seine Zielzellen eindringt, zum Nukleus transportiert wird und die Zelle nach IL6 Stimulation vermittelt durch das NS1-Protein wieder verläßt (Moffatt *et al.*, 1996). Damit ist noch nicht geklärt, wie und ob sich die katalytische Aktivität der Phospholipase A2 mit der physiologischen Funktion verbinden lassen.

Eine Phospholipase A2-Aktivität in nativen Viruskapsiden aus Fruchtwasser von B19-infizierten schwangeren Frauen konnte nicht gezeigt werden. Die Konzentration dieser Virusproben liegt bei 10^9 bis 10^{10} Partikel/ ml Blut ungefähr im picomolaren Bereich. Um die Phospholipase A2 experimentell nachweisen zu können, benötigt man jedoch Proteinkonzentrationen an VP1-Protein in Konzentrationen von 1 bis $2\mu\text{M}$. Unsere Methode ist in diesem Fall nicht sensitiv genug, um die Aktivität in infektiösem Virus zu bestimmen. Ein Zellkultursystem zur Viruszüchtung gibt es bei Parvovirus B19 nicht.

C5.2 Untersuchungen zur Enzymaktivität in vivo

Erhöhte Phospholipase A2 Aktivitäten können für eine Vielzahl an Krankheitsmanifestationen verantwortlich sein, weil sie durch die Synthese von inflammatorischen Mediatoren bei vielen Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen. Erhöhte Phospholipase A2 Aktivitäten konnten in der Synovialflüssigkeit und im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden (Murakami *et al.*, 1990; Mayer und Marshall, 1993). Desweiteren kann es im Organismus durch die Synthese von fremdartigen z.B. oxidierten Hydrolyseprodukten zur Produktion von Antiphospholipidantikörpern kommen, die dann für eine Vielzahl von

Krankheitsmanifestationen verantwortlich gemacht werden, wie z.B. Thrombo- und Granulozytopenien, Spontanaborte durch Thrombosen in der Plazenta oder auch rheumatoide Arthritis.

Durch hohe Viruskonzentrationen bei einer akuten Parvovirus B19-Infektion kann davon ausgegangen werden, daß auch eine relativ niedrige Phospholipase A2 Aktivität starke Konsequenzen auf den betroffenen Organismus hat. Um die Gegenwart einer viralen Phospholipase A2 Aktivität während einer B19-Infektion im Menschen zu zeigen, wurden Patienten mit einer akuten oder persistierenden Virusinfektion auf ihre Gegenwart von Antiphospholipidantikörpern (Anti-Phosphatidylserin, Anti-Cardiolipin und Anti- β 2-Glycoprotein) getestet. Insgesamt wurden sechs persistierend B19-infizierte, zehn akut und vier gesunde Personen im Alter von 10 bis 40 Jahren analysiert (Tabelle C.3).

PATIENTEN / ANZAHL	AKUTE B19- INFEKTION/ 19	PERSIST. B19- INFEKTION/ 6	ABGELAUFENE B19- INFEKTION/ 2	B19-NEGATIV/ 2
APA-positiv	6	2	0	0

Tabelle C.3 Immunreaktion zu Phospholipiden. Die Gegenwart von Antiphospholipidantikörpern (APA), (Anti-Phosphatidylserin, Anti-Cardiolipin und Anti- β 2-Glycoprotein) im Serum von Patienten mit akuter oder persistierender B19-Infektion und einer Kontrollgruppe aus gesunden Personen.

32% (6 von 19) der Personen mit akuter B19-Infektion enthielten Antiphospholipidantikörper, 33% (2 von 6) der persistierend B19-infizierten Patienten und 0% (0 von 4) der Personen mit einer vergangenen B19-Infektion bzw. B19-negativen Proben. In der normalen Population besitzen in der Regel nur 5% der Bevölkerung erhöhte Titer an Antiphospholipidantikörpern (Vila *et al.*, 1994), das bedeutet, daß die Wert von 32% und 33%, wie sie bei den Patienten mit akuter und persistierender B19-Infektion auftraten, signifikant erhöht ist.

In einer zweiten Gruppe wurden 35 SLE-Patienten (systemischer Lupus erythemathodes) und APS-Patienten (Antiphospholipid-Syndrom) oder Patienten mit Kombinationen von SLE und APS auf serologische Anzeichen einer vergangenen B19-Infektion und der Gegenwart von viralen Genomen im peripheren Blut untersucht (Tabelle C.4).

PATIENTEN (SLE/ APS) / ANZAHL	SLE /19		APS/SLE/ 10 + APS/ 6
	APA+/ 12	APA-/ 7	APA+/ 16
B19-IgG	9	6	13
B19-DNS	2	-	3

Tabelle C.4 Immunreaktion gegen Phospholipide. Gegenwart von Anti-B19-IgG und Virusgenomen (DNS) im Serum von SLE, SLE/ APS und APS-Patienten. Die Abkürzung APA steht für die Antiphospholipidantikörper, Anti-Phosphatidylserin, Anti-Cardiolipin und Anti- β 2-Glycoprotein.

Das Alter der Patienten lag zwischen 20 und 60 Jahren. 80% (28 von 35) zeigten erhöhte Werte von Antiphospholipidantikörpern. Wegen des relativ hohen Durchschnittsalters der Patienten waren 75 bis 90% der Patienten Anti-B19-IgG positiv, keiner war IgM-positiv. Dies entspricht dem Durchschnittswert der Seroprävalenz in einer menschlichen Population in einem Alter zwischen 20 und 60 Jahren, der bei 50 bis 80% liegt. Fünf der B19-IgG positiven Patienten (14%) hatten eine persistierende Infektion, wie durch positive Ergebnisse in der nested PCR gezeigt werden konnte. Dieser Wert für die Präsenz von Virusgenom ist deutlich höher als der Durchschnittswert, da im Normalfall bei 1000 Patienten nur einer DNS-positiv ist (Jordan *et al.*, 1998). Alle DNS-positiven Proben waren von Patienten mit erhöhten Titern an Antiphospholipidantikörpern. Zusätzlich wurden alle Patienten auf das Vorhandensein von Rheumafaktor (IgM und IgG) getestet. Es ergab sich keinerlei Korrelation zwischen dem Vorliegen von Antiphospholipidantikörpern und rheumafaktorpositiven Patienten. Deswegen kann eine generelle Stimulation des Immunsystems bei der Erkrankung ausgeschlossen werden. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Ergebnisse einen Hinweis darauf geben, daß B19-Infektionen die Produktion von Antiphospholipidantikörpern bei der Autoimmunkrankheit SLE und APS stimulieren können. Antiphospholipidantikörper stehen ebenfalls in Zusammenhang mit Spontanaborten von schwangeren Frauen, die durch Thrombosen in der Plazenta ausgelöst werden. Desweiteren treten Antiphospholipidantikörper bei inflammatorischen Prozessen auf, wie sie auch bei B19-assoziierten Arthritiden auftreten. In neuerer Zeit wurde die Kreuzreaktivität von Anti-Cardiolipin-Antikörpern mit Antikörpern, die gegen Lysophosphatidylcholin gerichtet sind, festgestellt. Bei letzteren handelt es sich um eine neue Klasse an Antiphospholipidantikörpern, die bei Patienten mit SLE entdeckt wurden (Wu *et al.*, 1999). Das Auftreten dieser Antikörper

wird zum einen auf oxidierte LDL (*low density protein*) Moleküle zurückgeführt, zum anderen auf erhöhte Phospholipase A2 Aktivitäten. Diese Verbindung könnte erklären, warum eine erhöhte Phospholipase A2 Aktivität für das Auftreten von Antiphospholipidantikörpern verantwortlich ist. Die Gegenwart einer Phospholipase A2-Aktivität in Parvovirus B19 sollte zukünftig bei infektionsinduzierten Autoimmunerkrankungen und bei B19-korrelierten Krankheitsmanifestationen mitberücksichtigt und untersucht werden.

C.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

- Es konnte gezeigt werden, daß B19-assoziierte Krankheitsmanifestationen nicht mit Aminosäurevariationen innerhalb der VP1-unique region zusammenhängen. Ebenso ist die Übertragung des Virus von der Mutter auf den Fötus bei *Hydrops fetalis* nicht mit bestimmten Variationen assoziiert.
- Um zu untersuchen, ob sich natürlich vorkommende Aminosäurevariationen auf die konformationelle Faltung der VP1-unique region auswirken, wurde ein Expressionssystem neu etabliert. Die Synthese und Reinigung findet über ein Fusionsprotein statt, welches aus einem modifizierten Intein und einer Chitin-Binde-Domäne besteht. So kann die Reinigung unter nativen Bedingungen über einer Chitin-Affinitätsmatrix stattfinden. Neben einem Standardisolat wurden variante Formen der VP1-unique region exprimiert und gereinigt.
- Biosensormessungen ergaben, daß sich Variationen innerhalb bzw. in der Umgebung eines charakterisierten Epitops von humanen, monoklonalen und neutralisierenden Antikörpern, die gegen die VP1-unique region gerichtet sind, nicht auf die berechneten Dissoziationskonstanten auswirken. Diese stellen ein Maß für die Quantifizierung der Antigen/Antikörper-Interaktionen. Die Bindung wird auch nicht beeinträchtigt, wenn das VP1-Protein Teil des Kapsids ist und die VP1-unique region auf dessen Oberfläche liegt, weder in rekombinanten virus-ähnlichen VP1/VP2-Partikeln, noch in nativen Viren.
- Spektroskopische Untersuchungen mittels UV/VIS-, Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie zeigen, daß die VP1-unique region stabil gefaltete Sekundärstrukturelemente besitzt, nicht jedoch eine globulär gefaltete Tertiärstruktur. Es ist kein struktureller Unterschied zwischen dem Standardisolat und einer ausgewählten Variante zu sehen. Das pH-Optimum der VP1-unique region liegt zwischen 8 und 9, Verschiebungen in den sauren Bereich zerstören die vorhandenen Sekundärstrukturelemente. Weder durch Hitze- noch durch GdmCl-Denaturierung konnte ein Übergang gezeigt werden, der das Vorhandensein einer globulär gefalteten Tertiärstruktur bestätigen könnte. Carboxy- und aminoterminal verkürzte Fragmente zeigen charakteristische Sekundärstrukturelemente. Es scheint, daß sich diese unabhängig voneinander ausbilden.

- Eine postulierte Phospholipase A2 im carboxyterminalen Teil der VP1-unique region wurde mittels einer neu etablierten Methode experimentell nachgewiesen. Sie ist Ca^{2+} -Ionen-abhängig und wird durch die Inhibitoren Manoalid und 4-Bromphenacylbromid gehemmt. Ihre Aktivität ist schwächer als die der Phospholipase A2 aus Bienengift, die als Kontrolle eingesetzt wurde. Ein aminoterminal verkürztes Fragment zeigt eine Aktivität, die etwas schwächer ist. Rekombinante VP1/VP2-virusähnliche Partikel zeigen ebenfalls Phospholipase A2-Aktivität. Aufgrund der geringen Menge konnte in nativen Kapsiden die Aktivität nicht nachgewiesen werden.
- Um einen Zusammenhang zwischen einer Phospholipase A2 Aktivität und B19-assoziierten Krankheitsmanifestationen herzustellen, wurde das Auftreten von Antiphospholipidantikörpern in Patienten mit akuten und persistierenden Infektionen, in SLE- und APS-Patienten untersucht. Es konnte schon in vorhergehenden Experimenten nachgewiesen werden, daß erhöhte Phospholipase A2-Aktivitäten mit dem Auftreten von Antiphospholipidantikörpern korrelieren. Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Antiphospholipidantikörpern und B19-IgG positiven bzw. DNS-positiven Patienten bestätigten unsere Vermutungen.

C.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen eine Menge ungeklärter Fragen auf, die bei zukünftigen Forschungsprojekten mitberücksichtigt werden sollten.

Unsere Ergebnisse klären nicht völlig die Frage nach einer Tertiärstruktur in der VP1-unique region. Vor allem ihre Aktivität als Phospholipase A2 spricht eher für das Vorhandensein einer solchen. Da eine Phospholipase A2 ihre Funktion in einer hydrophoben Umgebung wie z.B. in Membranen entfaltet, könnte sich die Tertiärstruktur vorzugsweise dort ausbilden. Desweiteren ist eine pH-abhängige Regulation bzw. über posttranslationale Modifikationen noch vollständig ungeklärt. Wie die VP1-unique region ihre Funktion als Phospholipase A2 ausübt, ob als Mono-, Di- oder Trimer, bzw. warum die VP1-unique region eine Phospholipase A2-Aktivität besitzt, bleibt ebenfalls eine noch ungeklärte Frage für zukünftige Forschungsprojekte. Ob sich die VP1-unique region des sekretorischen Weges zum Eintreten und Austreten aus der Zielzelle bedient muß weiter untersucht werden. Die Phospholipase A2 könnte bei der zellspezifischen Erkennung eine große Rolle spielen eventuell durch Bindung an einen noch nicht identifizierten Co-Rezeptor. Es wäre interessant zu wissen, welcher Teil der VP1-unique region bei den Immunfluoreszenzexperimenten für die spezifische Bindung an die mit Erythropoietin stimulierten MB-02-Zellen verantwortlich ist. Eine weitere Untersuchung der Substratspezifitäten könnte vielleicht den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Phospholipase A2-Aktivität und dem Auftreten von B19-assoziierten typischen Krankheitsmanifestationen erklären. Vor allem die Kreuzreaktivität von Anti-LPC-Antikörpern mit Anti-Cardiolipin-Antikörpern bedarf weiterer Aufklärung.

D Literaturverzeichnis

1. **Agbandje, M., S. Kajigaya, R. McKenna, N. S. Young, and M. G. Rossmann.** 1994. The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology* **203**:106-115.
2. **Anderson, L. J. and N.S. Young.** 1997. Human parvovirus B19. Monographs in *Virology* **20**.
3. **Anderson, M. J., P. G. Higgins, L. R. Davis, J. S. Willman, S. E. Jones, I. M. Kidd, J. R. Pattison, and D. A. Tyrrell.** 1985. Experimental parvoviral infection in humans. *J.Infect.Dis.* **152**:257-265.
4. **Anderson, M. J., M. N. Khousam, D. J. Maxwell, S. J. Gould, L. C. Happerfield, and W. J. Smith.** 1988. Human parvovirus B19 and hydrops fetalis. *Lancet* **1**:535.
5. **Anderson, S., M. Momoeda, M. Kawase, S. Kajigaya, and N. S. Young.** 1995. Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits. *Virology* **206**:626-632.
6. **Balfour, H. H. Jr., Schiff, G. M., and J. E. Bloom.** 1970. Encephalitis associated with erythema infectiosum. *J.Pediatr.* **77**:133.
7. **R. L. Bick.** 2000. Antiphospholipid-Thrombosis Syndromes. *Biomedical Progress* **13**:41-45.

8. **Bligh, E. G., and W. J. Dyer.** 1956. A rapid method of total lipid extracion and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* **37**:911-917.
9. **Blundell, M. C., C. Beard, and C. R. Astell.** 1987. In vitro identification of a B19 parvovirus promoter. *Virology* **157**:534-538.
10. **Brown, C. S., T. Jensen, R. H. Melen, W. Puijk, K Sugamura, H. Sato, and W. J. Spaan.** 1992. Localization of an immunodominant domain on baculovirus-produced parvovirus B19 capsids: correlation to a major surface region on the native virus particle. *J.Virol.* **66**:6989-6996.
11. **Brown, K. E., S. M. Anderson, and N. S. Young.** 1993. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**:114-117.
12. **Brugger, B., G. Erben, R. Sandhoff, F. T. Wieland, and W. D. Lehmann.** 1997. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:2339-2344.
13. **Cantalejo, M. M., G. Villaverde, V, G. B. las Heras, and M. E. Martin.** 2000. [Presence of anticardiolipin antibodies in a patient with polyarthritis caused by parvovirus B19]. *Med.Clin.(Barc.)* **115**:198-199.
14. **Cassinotti, P., G. Siegl, B. A. Michel, and P. Bruhlmann.** 1998. Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin. *J.Med.Virol.* **56**:199-204.
15. **Chipman, P. R., M. M. Agbandje, S. Kajigaya, K. E. Brown, N. S. Young, T. S. Baker, and M. G. Rossmann.** 1996. Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**:7502-7506.
16. **Chorba, T., Coccia, P., Holman, R., Tattersall, P., Anderson, L. J., Sudman, J., Young, N. S., Kurczynski, E., Saarinen, U. M., and R. Moir.** 1986. The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J.Infect.Dis.* **154**:383-393.

17. **Chou, T. N., T. C. Hsu, R. M. Chen, L. I. Lin, and G. J. Tsay.** 2000. Parvovirus B19 infection associated with the production of anti- neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) and anticardiolipin antibody (aCL). *Lupus* **9**:551-554.
18. **Cossart, Y. E., A. M. Field, B. Cant, and D. Widdows.** 1975. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* **1**:72-73.
19. **Crowl, R. M., Stoller, T. J., Conroy, R. R., and C. R. Stoner.** 1991. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J.Biol.Chem.* **266**:2647-2651.
20. **dem Borne, A. E., M. J. Bos, N. Joustra-Maas, J. F. Tromp, M. B. van't Veer, B. R. Wijngaarden-du, and P. A. Tetteroo.** 1986. A murine monoclonal IgM antibody specific for blood group P antigen (globoside). *Br.J.Haematol.* **63**:35-46.
21. **Doerig, C., B. Hirt, J. P. Antonietti, and P. Beard.** 1990. Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J.Virol.* **64**:387-396.
22. **Dorsch, S., B. Kaufmann, U. Schaible, E. Prohaska, H. Wolf, and S. Modrow.** 2001. The VP1-unique region of parvovirus B19: amino acid variability and antigenic stability. *J.Gen.Virol.* **82**:191-199.
23. **Erdman, D. D., E. L. Durigon, Q. Y. Wang, and L. J. Anderson.** 1996. Genetic diversity of human parvovirus B19: sequence analysis of the VP1/VP2 gene from multiple isolates. *J.Gen.Virol.* **77**:2767-2774.
24. **Fawaz-Estrup, F.** 1996. Human parvovirus infection: rheumatic manifestations, angioedema, C1 esterase inhibitor deficiency, ANA positivity, and possible onset of systemic lupus erythematosus. *J.Rheumatol.* **23**:1180-1185.
25. **Flunker, G., A. Peters, S. Wiersbitzky, S. Modrow, and W. Seidel.** 1998. Persistent parvovirus B19 infections in immunocompromised children. *Med.Microbiol.Immunol.Berl.* **186**:189-194.

26. **Franssila, R., Hokynar, K., and K. T. Hedman.** 2001. helper cell-mediated in vitro responses of recently and remotely infected subjects to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus B19. *J.Infect.Dis.* **183**:805-809.
27. **Frickhofen, N., J. L. Abkowitz, M. Safford, J. M. Berry, M. J. Antunez-de, A. Astrow, R. Cohen, I. Halperin, L. King, D. Mintzer, and a. et.** 1990. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann.Intern.Med.* **113**:926-933.
28. **Gareus, R., A. Gigler, A. Hemauer, V. M. Leruez, F. Morinet, H. Wolf, and S. Modrow.** 1998. Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J.Virol.* **72**:609-616.
29. **Gigler, A., Dorsch, S., Hemauer, A., Williams, C., Kim, S., Young, N. S., Zolla-Pazner, S., Wolf, H., Gorny, M. K., and S. Modrow.** 1999. Generation of neutralizing human monoclonal antibodies against parvovirus B19 proteins. *J.Virol.* **73**(3):1974-1979.
30. **Gil, F., A. Brun, A. Wigdorovitz, R. Catala, J. L. Martinez-Torrecuadrada, I. Casal, J. Salinas, M. V. Borca, and J. M. Escribano.** 2001. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett.* **488**:13-17.
31. **Gill, S. C. and P. H. von Hippel.** 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal.Biochem.* **182**:319-326.
32. **Goppelt-Struebe, M., U. Kyas, and K. Resch.** 1986. Phospholipase A2 activity in T-lymphocytes. *FEBS Lett.* **202**:45-48.
33. **Gratacos, E., P. J. Torres, J. Vidal, E. Antolin, J. Costa, A. M. Jimenez-de, V. Cararach, P. L. Alonso, and A. Fortuny.** 1995. The incidence of human parvovirus B19 infection during pregnancy and its impact on perinatal outcome. *J.Infect.Dis.* **171**:1360-1363.
34. **Gromnica-Ihle, E. and W. Schössler.** 2000. Antiphospholipid Syndrome. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **123**:67-76.

35. **Haseyama, K., T. Kudoh, Y. Yoto, N. Suzuki, and S. Chiba.** 1998. Analysis of genetic diversity in the VP1 unique region gene of human parvovirus B19 using the mismatch detection method and direct nucleotide sequencing. *J.Med.Virol.* **56**:205-209.
36. **Hasle, H., Kerndrup, G., Jacobsen, B. B., Heegaard, E. D., Hornsleth, A., and S. T. Lillevang.** 1994. Chronic parvovirus infection mimicking myelodysplastic syndrome in a child with subclinical immunodeficiency. *Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.* **16(4)**:329-333.
37. **Hemauer, A., K. Beckenlehner, H. Wolf, B. Lang, and S. Modrow.** 1999. Acute parvovirus B19 infection in connection with a flare of systemic lupus erythematoses in a female patient. *J.Clin.Virol.* **14**:73-77.
38. **Hemauer, A., Gigler, A., Searle, K., Beckenlehner, K., Raab, U., Broliden, K., Wolf, H., Enders, G., and S. Modrow.** 2000. Prevalence of NS1-specific antibodies in patients infected with parvovirus B19 and in pregnant women. *Journal of Medical Virology* **60**:48-55.
39. **Hemauer, A., A. von-Poblotzki, A. Gigler, P. Cassinotti, G. Siegl, H. Wolf, and S. Modrow.** 1996. Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *J.Gen.Virol.* **77**:1781-1785.
40. **Hokynar, K., Brunstein, J., Söderlund-Venermo, M., Kiviluoto, O. Partio E. K., Konttinen, Y., and K. Hedman.** 2000. Integrity and full coding sequence of B19 virus DNA persisting in human synovial tissue. *J.Gen.Virol.* **81**:1017-1025.
41. **Johnston, A. M., K. Hill, and B. E. Woodcock.** 2000. Lupus anticoagulant in a patient with parvovirus B19 infection. *Clin.Lab Haematol.* **22**:109-110.
42. **Jordan, J., B. Tiangco, J. Kiss, and W. Koch.** 1998. Human parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients. *Vox Sang.* **75**:97-102.
43. **Kariyawasam, H. H., K. M. Gyi, M. E. Hodson, and B. J. Cohen** 2000. Anaemia in lung transplant patient caused by parvovirus B19. *Thorax* **55**:619-620.

44. **Kerr, J. R., M. D. Curran, J. E. Moore, P. V. Coyle, and W. P. Ferguson.** 1995. Persistent parvovirus B19 infection [letter]. *Lancet* **345**:1118.
45. **Knisley, A. S., O'Shea, P. A., Anderson, L. J., and G. W. Gary.** 1988. Parvovirus B19, myocarditis and death in a 3-year old boy. *Pediatr.Pathol.* **8**:665.
46. **Köblinger, C., Uttenthaler, E., Drost, S., Aberl, F., Wolf, H., Brink, G., Stanglmaier, A., and E. A. Sackmann.** 1992. Quartz crystal biosensor for measurement in liquid. *Biosensors and Bioelectronics* **7**:397-404.
47. **Kramer, R. M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., McGray, P., Pingchang Chow, E., Tizard, R., and R. B. Pepinsky.** 1989. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂. *J.Biol.Chem.* **264**:5768-5775.
48. **Kramer, R. M., Roberts, E. F., Manetta, J., and J. E. Putnam.** 1991. The Ca²⁺(+)-sensitive cytosolic phospholipase A₂ is a 100-kDa protein in human monoblast U937 cells. *J.Biol.Chem.* **266**:5268-5272.
49. **Kudo, I., Chang, H. W., Hara, S., Murakami, M., and K. Inoue.** 1989. Characteristics and pathophysiological roles of extracellular phospholipase A₂ in inflamed sites. *Dermatologica* **179**:72-76.
50. **Lambeau, G. and M. Lazdunski.** 1999. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *TiPS* **20**:162-170.
51. **Langnas, A. N., R. S. Markin, M. S. Cattral, and S. J. Naides.** 1995. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology* **22**:1661-1665.
52. **Legendre, D. and J. Rommelaere .** 1992. Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J.Virol.* **66**:5705-5713.
53. **Liu, J. M., S. W. Green, T. Shimada, and N. S. Young.** 1992. A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J.Virol.* **66**:4686-4692.

54. **Loizou, S., J. K. Cazabon, M. J. Walport, D. Tait, and A. K. So.** 1997. Similarities of specificity and cofactor dependence in serum antiphospholipid antibodies from patients with human parvovirus B19 infection and from those with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **40**:103-108.
55. **Luzzi, G. A., J. B. Kurtz, and H. Chapel.** 1985. Human parvovirus arthropathy and rheumatoid factor. *Lancet* **1**:1218.
56. **Marchand, S., G. Tchernia, C. Hiesse, G. Tertian, J. Cartron, F. Kriaa, S. Boubenider, C. Goupy, D. Lecointe, and B. Charpentier.** 1999. Human parvovirus B19 infection in organ transplant recipients. *Clin.Transplant.* **13**:17-24.
57. **Mayer, R. J. and L. A. Marshall.** 1993. New insights on mammalian phospholipase A2(s); Comparison of arachidonyl-selective and -nonselective enzymes. *FASEB J.* **7**:339-348.
58. **Moffatt, S., N. Tanaka, K. Tada, M. Nose, M. Nakamura, O. Muraoka, T. Hirano, and K. Sugamura.** 1996. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *J.Virol.* **70**:8485-8491.
59. **Moffatt, S., N. Yaegashi, K. Tada, N. Tanaka, and K. Sugamura.** 1998. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J.Virol.* **72**:3018-3028.
60. **Momoeda, M., S. Wong, M. Kawase, N. S. Young, and S. Kajigaya.** 1994. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J.Virol.* **68**:8443-8446.
61. **Moore, T. L.** 2000. Parvovirus-associated arthritis. *Curr.Opin.Rheumatol.* **12**:289-294.
62. **Moore, T. L., R. Bandlamudi, S. M. Alam, and G. Neshier.** 1999. Parvovirus infection mimicking systemic lupus erythematosus in a pediatric population. *Semin.Arthritis Rheum.* **28**:314-318.

63. **Morey, A. L., D. J. Ferguson, and K. A. Fleming.** 1993. Ultrastructural features of fetal erythroid precursors infected with parvovirus B19 in vitro: evidence of cell death by apoptosis. *J.Pathol.* **169**:213-220.
64. **Mori, J., P. Beattie, D. W. Melton, B. J. Cohen, and J. P. Clewley.** 1987. Structure and mapping of the DNA of human parvovirus B19. *J.Gen.Virol.* **68**:2797-2806.
65. **Mukherjee, A. B., L. Miele, and N. Pattabiraman.** 1994. Phospholipase A2 enzymes: regulation and physiological role. *Biochem.Pharmacol.* **48**:1-10.
66. **Murakami, M., I. Kudo, H. Nakamura, Y. Yokoyama, H. Mori, and K. Inoue.** 1990. Exacerbation of rat adjuvant arthritis by intradermal injection of purified mammalian 14-kDa group II phospholipase A2. *FEBS Lett.* **268**:113-116.
67. **Musiani, M., Manaresi, E., Gallinella, G., Venturoli, S., Zuffi, E., and M. Zerbini.** 2000. Immunoreactivity against linear epitopes of parvovirus B19 structural proteins. Immunodominance of the amino-terminal half of the VP1-*unique region* of VP1. *J.Med.Virol.* **60**(3):347-352.
68. **Nagai, K., T. Morohoshi, T. Kudoh, Y. Yoto, N. Suzuki, and Y. Matsunaga.** 1992. Transient erythroblastopenia of childhood with megakaryocytopenia associated with human parvovirus B19 infection. *Br.J.Haematol.* **80**:131-132.
69. **Naides, S. J., L. L. Scharosch, F. Foto, and E. J. Howard.** 1990. Rheumatologic manifestations of human parvovirus B19 infection in adults. Initial two-year clinical experience. *Arthritis Rheum.* **33**:1297-1309.
70. **Nakano, T., Ohara, O., Teraoka, H., and H. Arita.** 1990. Glucocorticoids suppress group II phospholipase A2 production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. *J.Biol.Chem.* **265**:12745-12748.
71. **Nuhn, P. and K. Koch.** 1993. Hemmer der Phospholipase A2. *Pharmazie* **48**:494-508.
72. **O'Sullivan, M. G., D. C. Anderson, J. D. Fikes, F. T. Bain, C. S. Carlson, S. W. Green, N. S. Young, and K. E. Brown.** 1994. Identification of a novel

- simian parvovirus in cynomolgus monkeys with severe anemia. A paradigm of human B19 parvovirus infection [see comments]. *J.Clin.Invest.* **93**:1571-1576.
73. **Oka, S. and H. Arita.** 1991. Inflammatory factors stimulate expression of group I phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. *J.Biol.Chem.* **266**:9956-9960.
 74. **Orth, T., W. Herr, T. Spahn, T. Voigtlander, D. Michel, T. Mertens, W. J. Mayet, W. Dippold, and B. K. Meyer-zum.** 1997. Human parvovirus B19 infection associated with severe acute perimyocarditis in a 34-year-old man [letter]. *Eur.Heart J.* **18**:524-525.
 75. **Ozawa, K., G. Kurtzman, and N. Young.** 1986. Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science* **233**:883-886.
 76. **Ozawa, K. and N. Young.** 1987. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J.Virol.* **61**:2627-2630.
 77. **Pallier, C., A. Greco, J. Le -Junter, A. Saib, I. Vassias, and F. Morinet.** 1997. The 3' untranslated region of the B19 parvovirus capsid protein mRNAs inhibits its own mRNA translation in nonpermissive cells. *J.Virol.* **71**:9482-9489.
 78. **Pamidi, S., K. Friedman, B. Kampalath, C. Eshoa, and S. Hariharan.** 2000. Human parvovirus B19 infection presenting as persistent anemia in renal transplant recipients. *Transplantation* **69**:2666-2669.
 79. **PHLS.** 1990. Prospective study of human parvovirus (B19) infection in pregnancy. *BMJ* **300**:1166-1170.
 80. **Poblotzki, A. v., Gigler, A., Lang, B., Wolf, H., and S. Modrow.** 1995. Antibodies to parvovirus B19 NS-1 protein in infected individuals. *J.Gen.Virol.* **76**:519-527.
 81. **Potter, C. G., A. C. Potter, C. S. Hatton, H. M. Chapel, M. J. Anderson, J. R. Pattison, D. A. Tyrrell, P. G. Higgins, J. S. Willman, H. F. Parry, and a. et.** 1987. Variation of erythroid and myeloid precursors in the marrow and peripheral blood of volunteer subjects infected with human parvovirus (B19). *J.Clin.Invest.* **79**:1486-1492.

82. **Pruzanski, W. and P. Vadas.** 1990. Soluble phospholipase A2 in human pathology: Clinical-laboratory interface. *Adv.Exp.Biol.Med.* **279**:239-252.
83. **Reid, D. M., T. M. Reid, T. Brown, J. A. Rennie, and C. J. Eastmond.** 1985. Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description. *Lancet* **1**:422-425.
84. **Reitblat, T., T. Drogenikov, I. Sigalov, S. Oren, and D. London.** 2000. Transient anticardiolipin antibody syndrome in a patient with parvovirus B19 infection. *Am.J.Med.* **109**:512-513.
85. **Rosenfeld, S. J., K. Yoshimoto, S. Kajigaya, S. Anderson, N. S. Young, A. Field, P. Warrenner, G. Bansal, and M. S. Collett.** 1992. Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface [published erratum appears in *J Clin Invest* 1992 Dec;90(6):2609]. *J.Clin.Invest.* **89**:2023-2029.
86. **Rouger, P., P. Gane, and C. Salmon.** 1987. Tissue distribution of H, Lewis and P antigens as shown by a panel of 18 monoclonal antibodies. *Rev.Fr.Transfus.Immunohematol.* **30**:699-708.
87. **Saal, J. G., M. Steidle, H. Einsele, C. A. Muller, P. Fritz, and J. Zacher.** 1992. Persistence of B19 parvovirus in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol.Int.* **12**:147-151.
88. **Saikawa, T., S. Anderson, M. Momoeda, S. Kajigaya, and N. S. Young.** 1993. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. *J.Virol.* **67**:3004-3009.
89. **Sato, H., J. Hirata, N. Kuroda, H. Shiraki, Y. Maeda, and K. Okochi.** 1991. Identification and mapping of neutralizing epitopes of human parvovirus B19 by using human antibodies. *J.Virol.* **65**:5485-5490.
90. **G. Z. Sauerbrey.** 1959. The use of oscillators for weighting thin layers and for microweighting. *Z.Phys.* **155**:209-212.
91. **Saunders, P. W., M. M. Reid, and B. J. Cohen** 1986. Human parvovirus induced cytopenias: a report of five cases. *Br.J.Haematol.* **63**:407-410.

92. **Scheurlen, W., K. Ramasubbu, O. Wachowski, A. Hemauer, and S. Modrow.** 2001. Chronic autoimmune thrombopenia/neutropenia in a boy with persistent parvovirus B19 infection. *J.Clin.Virol.* **20**:173-178.
93. **Schleuning, M., G. Jager, E. Holler, W. Hill, C. Thomssen, C. Denzlinger, T. Lorenz, G. Ledderose, W. Wilmanns, and H. J. Kolb.** 1999. Human parvovirus B19-associated disease in bone marrow transplantation. *Infection* **27**:114-117.
94. **F. X. Schmid.** 1997. *Protein Structure: A Practical Approach*:261-297.
95. **Shade, R. O., M. C. Blundell, S. F. Cotmore, P. Tattersall, and C. R. Astell.** 1986. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J.Virol.* **58**:921-936.
96. **Skjoldesbrand-Sparre, L., T. Tolfvenstam, N. Papadogiannakis, B. Wahren, K. Broliden, and M. Nyman.** 2000. Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death. *BJOG.* **107**:476-480.
97. **Soderlund, M., C. S. Brown, W. J. Spaan, L. Hedman, and K. Hedman.** 1995. Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *J.Infect.Dis.* **172**:1431-1436.
98. **Sol, N., J. Le Junter, I. Vassias, J. M. Freyssinier, A. Thomas, A. F. Prigent, B. B. Rudkin, S. Fichelson, and F. Morinet.** 1999. Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J.Virol.* **73**:8762-8770.
99. **St.-Amand, J. and C. R. Astell .** 1993. Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology* **192**:121-131.
100. **Stahl, H. D., B. Hubner, B. Seidl, U. G. Liebert, d. H. van, I. B. Wilbrink, M. C. Kraan, F. Emmrich, and P. P. Tak.** 2000. Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. *Ann.Rheum.Dis.* **59**:342-346.

101. **L. Stryer.** Biochemie. 1991. Heidelberg, Berlin, New York, Spektrum Akademischer Verlag.
102. **Takahashi, Y., C. Murai, S. Shibata, Y. Munakata, T. Ishii, K. Ishii, T. Saitoh, T. Sawai, K. Sugamura, and T. Sasaki.** 1998. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**:8227-8232.
103. **Towbin, H., Staehelin, T., and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76(9)**:4350-4354.
104. **Trapani, S., M. Ermini, and F. Falcini.** 1999. Human parvovirus B19 infection: its relationship with systemic lupus erythematosus. *Semin.Arthritis Rheum.* **28**:319-325.
105. **Venturoli, S., G. Gallinella, E. Manaresi, G. Gentilomi, M. Musiani, and M. Zerbini.** 1998. IgG response to the immunoreactive region of parvovirus B19 nonstructural protein by immunoblot assay with a recombinant antigen. *J.Infect.Dis.* **178**:1826-1829.
106. **Vila, P., M. C. Hernandez, M. F. Lopez-Fernandez, and J. Batlle.** 1994. Prevalence, follow-up and clinical significance of the anticardiolipin antibodies in normal subjects. *Thromb.Haemost.* **72**:209-213.
107. **von-Poblotzki, A., C. Gerdes, U. Reischl, H. Wolf, and S. Modrow.** 1996. Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19. *J.Virol.* **70**:7327-7330.
108. **von-Poblotzki, A., A. Hemauer, A. Gigler, S. E. Puchhammer, F. X. Heinz, J. Pont, K. Laczika, H. Wolf, and S. Modrow.** 1995. Antibodies to the nonstructural protein of parvovirus B19 in persistently infected patients: implications for pathogenesis. *J.Infect.Dis.* **172**:1356-1359.
109. **Willwand, K. and B. Hirt.** 1993. The major capsid protein VP2 of minute virus of mice (MVM) can form particles which bind to the 3'-terminal hairpin of MVM replicative-form DNA and package single-stranded viral progeny DNA. *J.Virol.* **67**:5660-5663.

110. **Woolf, A. D., Campion, G. V., Chishick, A., Wise, S., Cohen, B. J., Klouda, P. T., Caul, O., and P. A. Dieppe.** 1989. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Arch.Intern.Med.* **149**:1153-1156.
111. **Wu, R., Svenungsson, E., Gunnarsson, I., Andersson, B., Lundberg, I., Schäfer Elinder, L., and J. Frostegard.** 1999. Antibodies against lysophosphatidylcholine and oxidized LDL in patients with SLE. *Lupus* **8**:142-150.
112. **N. Yaegashi.** 2000. Pathogenesis of nonimmune hydrops fetalis caused by intrauterine B19 infection. *J.Exp.Med.* **190**:65-82.
113. **Yoo, B. C., D. H. Lee, S. M. Park, J. W. Park, C. Y. Kim, H. S. Lee, J. S. Seo, K. J. Park, and W. S. Ryu.** 1999. A novel parvovirus isolated from Manchurian chipmunks. *Virology* **253**:250-258.
114. **Yoto, Y., T. Kudoh, K. Haseyama, N. Suzuki, and S. Chiba.** 1996. Human parvovirus B19 infection associated with acute hepatitis. *Lancet* **347**:868-869.
115. **N. S. Young.** 1988. Hematological and hematopoietic consequences of B19 parvovirus infection. *Semin.Hematol.* **25**(2):159-172.

E Anhang

E1 Auflistung der Veröffentlichungen

E1.1 Originalarbeiten

- **Andreas Gigler, Simone Dorsch, Andrea Hemauer, Constance Williams, Sonnie Kim, Neal S. Young, Susan Zolla-Pazner, Hans Wolf, Miroslaw K. Gorny and Susanne Modrow.** Generation of neutralizing human monoclonal antibodies against parvovirus B19 proteins. *Journal of Virology*, 1999, 73 (3), 1974-1979
- **Markus Kohlmann, Simone Dorsch, Susanne Modrow and Michael Przybylski.** Mass spectrometric epitope identification of the structural protein VP1 from parvovirus B19 with two human monoclonal antibodies. *Journal of Immunology*, 2001, eingereicht
- **Simone Dorsch, Bärbel Kaufmann, Uwe Schaible, Elke Prohaska, Hans Wolf und Susanne Modrow.** The VP1-unique region of parvovirus B19: amino acid variability and antigenic stability. *Journal of General Virology*, 2001, 82, 191-199

- **Simone Dorsch, Gerhard Liebisch, Bärbel Kaufmann, Philip von Landenberg, Jörg H. Hoffmann, Wolfgang Drobnik und Susanne Modrow.** The VP1-unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity – implications for pathogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 2001, eingereicht

E1.2 Buchbeiträge

- **Simone Dorsch, Andreas Gigler, Andrea Hemauer, Karin Beckenlehner, Susan Zolla-Pazner, Hans Wolf, Susanne Modrow and Mirosław K. Gorny.** Epitope mapping of human monoclonal antibodies against parvovirus B19 proteins. *Peptides* 1998, Sandor Bajusz and Ferenc Hudecz (Eds.), 1999 Akademiai Kiado, Budapest, 576-577

E1.3 Kongressbeiträge

- Poster auf der *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie* 1998 in Regensburg und ein Poster-Kurzvortrag: **Simone Dorsch, Andreas Gigler, Susan Zolla-Pazner, Hans Wolf, Susanne Modrow und Mirosław K. Gorny** „Produktion von humanen monoklonalen Antikörpern gegen Parvovirus B19 Proteine“
- Poster auf der *International Conference on Antiviral Research* 1998 in San Diego: **Andreas Gigler, Simone Dorsch, Andrea Hemauer, Ulla Raab, Karin Beckenlehner, Susan Zolla-Pazner, Hans Wolf, Susanne Modrow and Mirosław K. Gorny** „Generation of human monoclonal antibodies against Parvovirus B19“
- Poster auf dem *European Peptide Symposium* 1998 in Budapest: **Simone Dorsch, Andreas Gigler, Andrea Hemauer, Susan Zolla-Pazner, Hans Wolf, Susanne Modrow and Mirosław K. Gorny** “Epitope Mapping of human monoclonal antibodies against parvovirus B19 proteins”
- Poster auf der *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie* 1999 in Bremen: **Simone Dorsch, Andreas Gigler, Andrea Hemauer, Karin Beckenlehner und Susanne**

Modrow “Untersuchung der Struktur und Funktion der *unique region* im Strukturprotein VP1 des Parvovirus B19”

- Poster auf dem *German Peptide Symposium* 1999 in Wien: **Markus Kohmann, Simone Dorsch, Susanne Modrow, Michael Przybylski** “Mass spectrometric epitope mapping of parvovirus B19 structural protein VP1 using two human monoclonal antibodies”
- Poster auf dem *Parvovirus Workshop* 1999 in Granada, Spanien: **Simone Dorsch, Markus Kohlmann, Andreas Gigler, Karin Beckenlehner, Hans Wolf, Michael Przybylski und Susanne Modrow** “Characterization of the VP1-unique region of parvovirus B19”
- Poster auf dem *DFG-Forschergruppen-Symposium* 2000 auf der Burg Falkenstein: **Simone Dorsch, Bärbel Kaufmann, Uwe Schaible, Elke Prohaska, Hans Wolf und Susanne Modrow** “The VP1-unique region of parvovirus B19: Function, conformation and immunological reactivity”
- Poster auf der *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie* 2000 in Wien: **Simone Dorsch, Uwe Schaible, Bärbel Kaufmann, Karin Beckenlehner, Andreas Gigler, Hans Wolf, Elke Prohaska und Susanne Modrow** “Charakterisierung der Wechselwirkung neutralisierender, humaner, monoklonaler Antikörper mit dem VP1-Protein von Parvovirus B19 mit Hilfe eines Schwingquartz-Biosensors”
- Poster auf der Tagung *Biosensors* 2000 in San Diego, USA: **Sabine Hauck, Simone Dorsch, Uwe Schaible, Elke Prohaska, Susanne Drost und Hans Wolf** “Characterisation of Protein Interaction using a Quartz Crystal Biosensor”
- Poster auf dem *Parvovirus Workshop* 2000 in Mont Tremblant, Kanada: **Simone Dorsch, Bärbel Kaufmann, Uwe Schaible, Elke Prohaska, Hans Wolf und Susanne Modrow** “Variations in the VP1-unique region of parvovirus B19 do not influence antibody binding and protein conformation”

- Poster auf der *Faltertagung* 2000 in Halle/Wittenberg: **Simone Dorsch, Bärbel Kaufmann, Uwe Schaible, Elke Prohaska, Hans Wolf und Susanne Modrow** “Variations in the VP1-unique region of parvovirus B19 do not influence antibody binding and protein conformation”
- Poster auf der *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie* 2001 in Dresden: **Simone Dorsch, Gerhard Liebisch, Jörg Hoffmann, Gerd Schmitz, Hans Wolf, Wolfgang Drobnik und Susanne Modrow** “Die unique region im Kapsidprotein VP1 des Parvovirus B19 hat Phospholipase-A2 Aktivität”
- Poster auf der *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie* 2001 in Dresden: **Simone Dorsch, Hans Wolf und Susanne Modrow** “Strukturelle Charakterisierung der VP1-unique region von Parvovirus B19”
- Poster auf der *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie* 2001 in Dresden: **Kerstin Zarniko, Simone Dorsch, Karin Beckenlehner, Bärbel Kaufmann, Hartwig Lehmann, Hans Wolf und Susanne Modrow** “Untersuchung der IgG-Immunantwort von chronisch infizierten Arthritis-Patienten gegen das VP1-Protein von Parvovirus B19 im ELISA-Test”

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders bedanken möchte ich mich bei

- Prof. Dr. Susanne Modrow, die Betreuerin meiner Arbeit. Ein herzliches Dankeschön für die Unterstützung und Förderung während meiner Promotion. Unsere Arbeitsgruppenseminare waren immer ein besonderer Spaß.
- Prof. Dr. Hans Wolf für die Bereitstellung unserer Laborplätze am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene.
- Meinen aktuellen und ehemaligen Laborkollegen Andrea, Andreas, Anja, Bärbel, Jürgen, Karin, Ulla, Tanja und Frau Brunner, für das nette und hilfsbereite Arbeitsklima.
- Jörg Hoffmann und Kerstin Zarniko, die sich im Rahmen ihrer Diplomarbeiten mit der VP1-unique region plagen mußten.
- Allen meinen Ko-Autoren.
- Allen Mitgliedern vom Institut für das freundliche Arbeitsklima und die kleinen Hilfen im Alltag.
- Meinen Eltern und meiner Schwester Daniela, für ihre Liebe und ihr Vertrauen in mich und meine Arbeit.
- Meinem Freund Roland, für seine Liebe, Geduld und Unterstützung.